

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt

Klinische Forschergruppe „Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation unter
besonderer Berücksichtigung von Essstörungen und Adipositas“

Ehemaliger Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Mutationssuche im *Ghrelin-Gen* bei extrem übergewichtigen Kindern
und Jugendlichen und normalgewichtigen Kontrollen**

Inaugural-Dissertation
zum Erlangen des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereiche Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, vorgelegt von

Anne Starke, geb. Hoch
aus Darmstadt

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg am 27.09.2007

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. J. Hebebrand

Koreferent: Prof. Dr. M. Koch

Zusammenfassung

Die Regulation des Körpergewichts beruht auf einer Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen (Hebebrand und Renschmidt, 1995a). Zwillings- und Familienstudien (Moll et al., 1991; Bouchard et al., 1990; Zonta et al., 1987; Stunkard et al., 1986) deuten auf eine starke genetische Prädisposition des menschlichen Körpergewichts hin. Das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und –verbrauch ist beim Menschen über längere Zeitabschnitte bemerkenswert präzise. Eine längerfristige Störung dieser Energiehomöostase führt entweder zu Unter- oder Übergewicht. In den westlichen Industrieländern und zunehmend auch in den Entwicklungsländern steigt Adipositas in Zahl und Schweregrad bei Erwachsenen und Kindern. Jeder zweite Deutsche ist übergewichtig, 16 % der deutschen schulpflichtigen Kinder und Jugendlichen sind übergewichtig (Kurth et al., 2007). Nach Angaben der Deutschen Adipositas Gesellschaft entfallen etwa 5 % der Kosten des Gesundheitssystems auf Interventionen gegen Adipositas und deren Folgeerkrankungen.

Diese Arbeit untersucht die Pathogenese der Adipositas auf genetischer Ebene. Tiermodelle belegen, dass Adipositas durch monogene Erbgänge hervorgerufen werden kann. Für einzelne Mausmodelle wurden bereits menschliche Homologe identifiziert und auf Mutationen untersucht. Bis Oktober 2005 wurde von 50 nach klassischem Mendelschen Erbgang bedingten Adipositasformen berichtet (Rankinen et al., 2006). Des Weiteren wird nach so genannten Kandidatengenen geforscht. Das sind Gene, die aufgrund ihrer Funktion und/oder ihres Expressionsmusters in einen möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese von Adipositas gestellt werden. Immer mehr Studien berichteten (bis Oktober 2005) von bisher 127 solcher Kandidatengenen, von denen ungefähr 52 mit zwei oder mehr positiven Ergebnissen bestätigt wurden. Auf der zum zwölften Mal überarbeiteten Adipositas-Gen-Karte wurden auf jedem Chromosom, bis auf dem Y-Chromosom, mögliche Adipositas-Gene eingezeichnet (Rankinen et al., 2006). Adipositas beruht jedoch überwiegend nicht auf monogener sondern vielmehr auf polygenetischer Basis. Um zugrunde liegenden Gene zu finden, verfolgt man u. a. den Ansatz der Quantitative Trait Loci (QTL). Derzeit sind 408 QTLs in Tiermodellen und 253 homologe QTL-Regionen bekannt (Rankinen et al., 2006). Der hohe Grad der Komplexität in der Regulation des menschlichen Körpergewichts resultiert aus der

Vielzahl der involvierten hormonellen Regelkreisläufe und der sie beeinflussenden Faktoren (Bell et al., 2005; Scharzt et al. 2000).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein Kandidatengen auf dessen Beteiligung an der menschlichen Gewichtsregulation und Adipositasentwicklung zu analysieren. Hierfür wurde das *Ghrelin-Gen* in Studiengruppen aus Patienten mit Adipositas, normalgewichtigen und untergewichtigen Kontrollen untersucht. Ghrelin wurde im Dezember 1999 von Kojima et al. als ein endogener Ligand für den Wachstumshormonsekretionsrezeptor („growth hormone secretagogues receptor“, GHSR) identifiziert. Studien an Tiermodellen belegen, dass Ghrelin neben der stimulierenden Wirkung auf die Wachstumshormon-Sekretion auch an der Regulierung der Energiehomöostase beteiligt ist. Letzteres wird über Nahrungsaufnahme und Fettstoffwechsel gesteuert (Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Cowley et al., 2003; Wortley et al., 2005; Zigman et al., 2005; Bhatti et al., 2006).

Zuerst wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die kodierenden Regionen des *Ghrelin-Gens* amplifiziert. Die Mutationssuche im *Pre-Pro-Ghrelin*, welches aus vier Exons besteht, erfolgte mittels Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP). Das erste und zweite Exon kodieren zusammen für das biologisch aktive Protein (Wajnrajch et al., 2000). Die Mutationssuche in dem 694 bp umfassenden Sequenzabschnitt führte über Sequenzierung zur Identifikation folgenden Varianten:

Im ersten Exon fand sich eine Zwei-Basenpaar-Deletion mit resultierendem Frameshift ab der 34. Aminosäure und Einbau von 36 aberranten Aminosäuren. Bei der Mutationssuche des zweiten Exons bestätigten sich die zwei bereits bekannte Polymorphismen (152 G>A, Arg-51-Gln und 214 C>A, Leu-72-Met; Wajnrajch et al., 2000; Korbonits et al., 2002; Ukkola et al., 2001). Des Weiteren wurde eine Ein-Basenpaar-Deletion im davor liegenden Intron gefunden. Im dritten Exon konnte ein bis dahin unbekannter Polymorphismus (269 A>T, Gln-90-Leu) entdeckt werden, der, wie die beiden anderen SNPs, zu einem Aminosäuren (AS)-Austausch führt. Die Untersuchung des vierten -und mit 18 Basenpaaren- kleinsten Exons erbrachte keine Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp. Die detektierten Polymorphismen wurden über Restriktionslängen-Polymorphismus-PCR (RFLP-PCR) und allelspezifische Amplifikation (ARMS) verifiziert.

Die beiden gefundenen Deletionen traten jeweils nur bei einem Probanden auf und sind daher seltene genetische Varianten. Die Deletion mit Frameshift im ersten Exon fand sich bei einem normalgewichtigen Probanden, der laut anschließender Analyse der Gewichtsentwicklung und des Essverhaltens keine pathologischen Besonderheiten aufwies. Es ist von einer Haplo-Insuffizienz auszugehen, die mit einem Normalgewicht einhergehen kann. Die andere Deletion, die bei einem adipösen Probanden gefunden wurde, lag im Intron. Eine Beteiligung an der Pathophysiologie von Adipositas ist für eine im Intron liegende und somit ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des Genproduktes eher unwahrscheinlich. Es könnte jedoch ein Kopplungsungleichgewicht mit einem anderen Allel vorliegen. Letztlich wurde diese Sequenzvariante nur bei einem Probanden nachgewiesen.

Die identifizierten und sequenzierten Polymorphismen wurden für Assoziationsstudien zum Phänotyp Adipositas eingesetzt. Im Gegensatz zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen von Korbonits et al. (2002), Ukkola et al. (2001) und einer später veröffentlichten Studie von Steinle et al. (2005) lag bei unsrer Studie keine Assoziation zur Adipositas vor. Die beschriebenen Polymorphismen traten bei adipösen wie bei normalgewichtigen Probanden ohne signifikanten Unterschied auf. Die Assoziationsstudie zum neu identifizierten Polymorphismus (269 A>T; Gln-90-Leu) im dritten Exon führte zuerst zu einem nominellen p-Wert $< 0,05$. Diese Assoziation konnte in einer mit untergewichtigen Studenten und normalgewichtigen Erwachsenen unabhängigen Stichprobe jedoch nicht bestätigt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	LITERATURÜBERSICHT	1
1.1	KÖRPERGEWICHT	1
1.1.1	Regulation des Körpergewichtes.....	1
1.1.2	Zentrale Regulierung des Körpergewichtes	1
1.1.3	Gewichtsklassen	2
1.1.4	Adipositas.....	4
1.2	FORMALGENETISCHE ASPEKTE DES KÖRPERGEWICHTS	6
1.2.1	Umweltfaktoren	6
1.2.2	Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien zum Körpergewicht	7
1.3	MOLEKULARGENETISCHE ASPEKTE DES KÖRPERGEWICHTS	8
1.3.1	Tiermodelle	8
1.3.1.1	Monogene Mausmodelle	8
1.3.1.2	Transgene und KO-Mausmodelle	8
1.3.1.3	Polygene Mausmodelle.....	9
1.3.2	Humane Befunde	9
1.3.2.1	Monogene Formen der humanen Adipositas	9
1.4	IDENTIFIZIERUNG VON HUMANEN GENEN ZUR GEWICHTSREGULATION	11
1.4.1	Genom-Scan	11
1.4.2	Kandidatengenansatz	12
1.4.3	Assoziationsstudien	12
1.5	GHRELIN.....	13
1.5.1	Regulierung des Wachstumshormons.....	13
1.5.2	Klonierung/ Struktur	14
1.5.3	Expressionsmuster.....	15
1.5.4	Funktion	18
1.5.4.1	Tiermodelle.....	18
1.5.4.2	Befunde beim Menschen	20
2	PROBANDENKOLLEKTIV UND MATERIAL	23
2.1	PROBANDENKOLLEKTIV	23
2.1.1	Rekrutierung des Probandenkollektivs.....	23
2.1.2	Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie	23
2.1.3	Studiengruppen	24
2.1.4	Untersuchungsgut	24
2.2	MATERIAL	24
2.2.1	Verwendete Großgeräte	24
2.2.2	Chemikalien.....	26
2.2.3	Puffer.....	27
2.2.4	Enzyme	28

2.2.5	Oligonukleotide	28
3	METHODEN	29
3.1	DNA-EXTRAKTION	29
3.1.1	DNA-Verdünnung.....	30
3.1.2	Herstellung von Mikrotiterplatten.....	31
3.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	31
3.2.1	Allgemeines zur PCR.....	31
3.2.2	Optimierung der PCR.....	33
3.2.3	Spezielle PCR-Rezepte für Ghrelin Exon 1-4.....	34
3.3	GEL-ELEKTROPHORESE	35
3.3.1	Allgemeines zur Gel-Elektrophorese.....	35
3.3.2	Spezielle Durchführung der Gel-Elektrophorese	36
3.4	SINGLE-STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM (SSCP).....	37
3.4.1	Allgemeines zur SSCP	37
3.4.2	Spezielle Durchführung der SSCP für Ghrelin Exon 1-4.....	38
3.4.3	Silberfärbung (modifiziert nach Budowle et al., 1991)	39
3.5	SEQUENZIERUNG	39
3.5.1	Prinzip der Sequenzierung	39
3.5.2	Durchführung der Automatischen Sequenzierung am LiCor 4200	40
3.6	PCR-RESTRIKTIONSLÄNGEN-POLYMORPHISMUS (PCR-RFLP)	42
3.6.1	Allgemeines zur PCR-RFLP.....	42
3.6.2	Spezielle Durchführung der PCR-RFLP	42
3.7	ALLELSPEZIFISCHE AMPLIFIKATION (ARMS-TEST).....	43
3.7.1	Allgemeines zu ARMS.....	43
3.7.2	Spezielle Durchführung der ARMS-PCR.....	44
3.8	STATISTISCHE VERFAHREN	45
3.8.1	Assoziationsstudie	45
3.8.1.1	Kopplung	45
3.8.1.2	Assoziation	46
3.8.1.3	Durchführung einer Assoziationsstudie	46
3.8.2	Teststatistiken.....	48
3.8.2.1	χ^2 -Test	48
3.8.2.2	χ^2 -Test nach Pearson	48
3.8.2.3	Hardy-Weinberg-Äquilibrium	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	ERMITTLUNG VON SEQUENZVARIANTEN IN DER KODIERENDEN REGION DES <i>GHRELIN</i> -GENS	50
4.1.1	Seltene genetische Varianten.....	53
4.1.1.1	Die Frameshift-Mutation im ersten Exon	53
4.1.1.2	Die 1 bp Deletion im ersten Intron	54
4.1.2	Polymorphismen.....	54

4.1.2.1	Der 152 G>A Polymorphismus	55
4.1.2.2	Der 214 C>A Polymorphismus.....	55
4.1.2.3	Der 269 A>T Polymorphismus	55
4.2	STUDIENGRUPPE	56
4.3	ERGEBNISSE DER ASSOZIATIONSSTUDIE FÜR DIE POLYMORPHISMEN IN EXON 2 UND 3.....	56
4.3.1	<i>Bewertung der Assoziationsstudie für den 152 G>A Polymorphismus in Exon 2.....</i>	57
4.3.2	<i>Bewertung der Assoziationsstudie für den 214 C>A Polymorphismus in Exon 2.....</i>	58
4.3.3	<i>Bewertung der Assoziationsstudie für den 269 A>T Polymorphismus in Exon 3</i>	58
5	DISKUSSION	60
5.1	BEWERTUNG DER DETEKTIERTEN SEQUENZVARIANTEN.....	60
5.1.1	<i>Ghrelin</i>	60
5.1.2	<i>Ergebnisbewertung</i>	61
5.1.3	<i>Befunde anderer Arbeitsgruppen zu den Polymorphismen Arg-51-Gln & Leu-72-Met.....</i>	62
5.2	REFERENZ.....	65
5.3	KANDIDATENGENANSATZ ZUR IDENTIFIZIERUNG BETEILIGTER ALLELE	66
5.3.1	<i>Bewertung des Kandidatengenansatzes</i>	66
5.3.2	<i>Bewertung von klassischen Fall-Kontrollstudien.....</i>	66
6	ANHANG	68
6.1	LITERATURVERZEICHNIS	68
6.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	80
6.3	TABELLENVERZEICHNIS	81
6.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
6.5	VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER	83
6.6	DANKSAGUNG	84

1 Literaturübersicht

1.1 Körpergewicht

1.1.1 Regulation des Körpergewichtes

Die Regulation des Körpergewichts ist ein komplexer Vorgang, der durch viele verschiedene periphere sowie zentrale Prozesse gesteuert wird. Alle Vorgänge, die zur Gewichtsregulation beitragen, sind im Detail noch nicht entschlüsselt.

Das Körpergewicht wird von dem Verhältnis der Energiezufuhr durch Nahrung zum Energieverbrauch durch z. B. Grundumsatz, Muskularbeit oder Prozesse des Wachstums determiniert. Komplexe Verhaltensweisen wie körperliche Aktivität oder Geschmacksempfinden werden sowohl durch genetische als auch durch exogene Faktoren bestimmt (Hebebrand und Renschmidt, 1995). Neben kurzfristigen Missverhältnissen in der Energiebilanz scheint auf lange Sicht betrachtet, das Körpergewicht bei physischer und psychischer Gesundheit extrem gut reguliert zu sein. Obwohl ein Erwachsener jährlich etwa vier Gigajoule mit der Nahrung aufnimmt, resultiert lediglich eine Gewichtszunahme von im Schnitt 100-400 g (Hebebrand et al., 1995).

1.1.2 Zentrale Regulierung des Körpergewichtes

Um ein besseres Verständnis des komplexen zentralen Regelmechanismus zu erlangen, hilft es die physiologischen Abläufe näher zu betrachten. Mit Hilfe von Läsionsversuchen konnte dem Hypothalamus eine essentielle Rolle in der Regulierung der Nahrungszufuhr und des Körpergewichtes zugeteilt werden. Es wurde der ventromediale Kern als das „Sättigungszentrum“ und der laterale Kern (Ncl. lateralis) als das „Hungerzentrum“ deklariert (Hetherington et Ranson, 1940; Anand et Brobeck, 1951). Durch Stimulation des Ncl. ventromedialis konnte die Nahrungsaufnahme gedrosselt und durch eine beidseitige Läsion dieses Kerns Hyperphagie und Adipositas gefördert werden. Gegensätzliche Reaktionen finden sich bei Stimulation oder Läsion des Ncl. lateralis (Hetherington und Ranson, 1940; Anand und Brobeck, 1951). Diese Arbeitshypothese ist über einen langen Zeitraum angewendet worden.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde intensiv an den komplexen Regelmechanismen des Körpergewichtes geforscht. Mit den bis jetzt erlangten Erkenntnissen über Neuropeptide wie z. B. Leptin und Neuropeptid Y (NPY) weicht man von definierten Zentren im Hirn ab und verfolgt die Hypothese eines neuronalen Netzwerks, das die Nahrungsaufnahme mittels zahlreicher im Hypothalamus exprimierter Neuropeptide reguliert (Elmquist et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Kawano et al., 2002; Bell et al., 2005; Dhillon, 2007; Doucet et al., 2007). Eine der wichtigsten Regelstellen der Neuropeptide scheint der Ncl. arcuatus zu sein. Weitere neuronale Regelstellen der Energiehomöostase müssten die Hirnareale sein, mit denen der Ncl. arcuatus in Verbindung steht. Dazu gehören die hypothalamischen Kerne, Ncl. paraventricularis, Ncl. lateralis, Zona incerta und Fornix (Elmquist et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Kawano et al., 2002). In den erwähnten Kernen lassen sich Neurone nachweisen, die diverse Neuropeptide speichern. Die Neuropeptide werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die orexigenen Neuropeptide, die den Appetit und die Nahrungsaufnahme stimulieren: Melaninkonzentrierendes Hormon, Orexine 1 und 2, Neuropeptid Y (NPY), Agouti related peptide (AGRP), sowie Ghrelin und die anorexigene Neuropeptide, welche die Nahrungsaufnahme hemmen: α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH), Cocain- und Amphetamin-reguliertes Transcript, Thyrotropin-releasing Hormon, Corticotropin-releasing Hormon, Cholezystokinin (Flier und Maratos-Flier, 1998; Sawchenko, 1998; Elmquist et al., 1999; Inui, 1999; Kalra et al., 1999; Bell et al., 2005; Arora und Anubhuti, 2006; Mancini und Halpern, 2006; Dhillon, 2007; Doucet et al., 2007). Die genaue Identifikation aller Regelstellen und Neuropeptide wird weiter untersucht. Dabei ist davon auszugehen, dass es zur Regulierung der Energiehomöostase mehrere integrierende, redundante Bahnen gibt.

1.1.3 Gewichtsklassen

Das Normalgewicht wird häufig nach der Formel von Broca berechnet:

$$\text{Körpergewicht} = \text{Körpergröße (cm)} - 100$$

Diese Formel kann aber nur bei Erwachsenen mit einer Körperlänge zwischen 160 cm und 180 cm angewandt werden (Duale Reihe, Innere Medizin, 2001)

In der modernen Epidemiologie wird das Körpergewicht mittels des Body-Mass-Index (BMI), auch als Quetelet-Index bekannt, berechnet. Mit Hilfe der BMI-Formel ergibt sich ein um die Körpergröße bereinigtes Maß. Er wird wie folgt berechnet (Garrow und Webster, 1985):

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Körperhöhe in m})^2}$$

Der BMI korreliert hoch mit dem Körpergewicht und gering mit der Körperhöhe (Watson et al., 1979). In zahlreichen Untersuchungen (Micozzi et al., 1986; Spyckerelle et al., 1988; Daniels et al., 1997; Pietrobelli et al., 1998) konnte belegt werden, dass der BMI ein akzeptables Maß für die Gesamt-Körper-Fett-Masse darstellt.

Die World Health Organization (WHO) unterscheidet anhand des BMIs verschiedene Gewichtsklassen bei Erwachsenen (WHO 2000):

Gewichtsklasse	BMI in kg/m ²
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Präadipositas	25,0 – 29,9
Moderate Adipositas (Grad I)	30,0 – 34,9
Mittelgradige Adipositas (Grad II)	35,0 – 39,9
Morbide Adipositas (Grad III)	> 40,0

Tab. 1.1: Einteilung in Gewichtsklassen (nach der WHO-Klassifizierung 2000)

Die Einteilungskriterien der WHO sind nur für Erwachsene sinnvoll. Auf Kinder, Jugendliche sowie junge Erwachsene können diese BMI-Kriterien nicht angewandt werden (Hebebrand und Remschmidt, 1995). Der BMI von Kindern- und Jugendlichen wird entsprechend den physiologischen Änderungen der prozentualen Körperfettmasse deutlich von Alter und Geschlecht beeinflusst (Gray et al., 1989). Der BMI erreicht im ersten Lebensjahr den höchsten Anstieg, um dann nach einem Abfall, ab dem 7. Lebensjahr wieder kontinuierlich anzusteigen. Ab dem Alter zwischen 55 und 65 Jahren nimmt der BMI wieder ab (Rolland-Cachera et al., 1991). Zur Beurteilung der Gewichtsklasse muss bei Kindern deshalb Alter und Geschlecht berücksichtigt werden. Die geschlechtsspezifischen Altersperzentile stellen die BMI-Bereiche dar, die für die jeweilige Population eines spezifischen Alters und Geschlechts gelten (Hebebrand und Remschmidt, 1995). Kromeyer-Hauschild et al. (2001) erstellten überregionale BMI-Referenzwerte für Kinder und Jugendliche in Deutschland. Dabei wurden Daten aus 17 bereits durchgeführten Studien in verschiedenen Regionen Deutschlands genutzt (insgesamt 17.147 Jungen und 17.275 Mädchen im Alter von 0-18 Jahren).

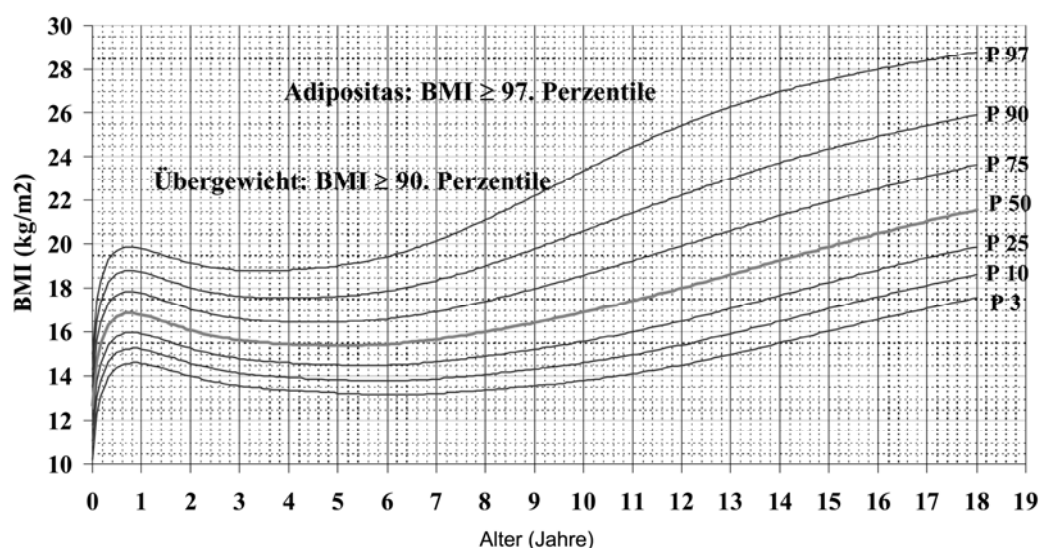


Abb. 1.1: BMI Perzentilen für Mädchen im Alter von 0-18 Jahren (nach Kromeyer-Hauschild et al. 2001)

Die Deutsche Adipositas Gesellschaft legt den Referenzwert für Adipositas bei Kindern und Jugendlichen auf die 90., 97. und 99,5. BMI-Perzentile fest.

Gewichtsklasse	Altersperzentile
Untergewicht	< 15.
Übergewicht	90. – 96,9
Adipositas	97. – 99,4.
Extreme Adipositas	> 99,5

Tab. 1.2: BMI-Altersperzentilen für verschiedene Gewichtsklassen (nach den Leitlinien der Deutschen Adipositas Gesellschaft 2002)

1.1.4 Adipositas

Adipositas liegt vor, wenn der Körperfettanteil an der Gesamtkörpermasse überdurchschnittlich erhöht ist. Da der Körperfettanteil sich methodisch nur mit kostspieligem Aufwand exakt bestimmen lässt, hat sich die Verwendung des einfach berechenbaren BMI zur Abschätzung des Körperfettanteils bei Erwachsenen weltweit durchgesetzt. Zur Gewichtsklasseneinteilung von Kindern und Jugendlichen werden wegen der schwankenden Körperfettanteile die geschlechtsspezifischen BMI-Altersperzentilenkurven bevorzugt. Als adipös wird ein Individuum ab einem BMI über 30 kg/m^2 bzw. ab der 97. BMI-Perzentile bezeichnet. Eine genauere Quantifizierung des Ausprägungsgrades der extremen Adipositas kann durch die Verwendung der Standard-Deviation-Scores (SDS-Werte) erreicht werden. SDS-Werte sagen

aus, um ein wieviel Faches der Standardabweichung ein individueller BMI vom bevölkerungsbezogenen Durchschnitt abweicht (Cole und Green, 1992).

Der Anteil adipöser Kinder und Jugendlicher wird in Deutschland auf 6 % geschätzt, der der übergewichtigen auf 16 % (Kurth et al., 2007). Etwa 50-60 % aller extrem adipösen Erwachsenen waren bereits als Kinder adipös (Strauss et al., 1999). Je nach Eintrittsalter des Übergewichts lässt sich das Fortbestehen der Adipositas abschätzen: Im Alter von unter 3 Jahren ist eine Aussage über den BMI im Erwachsenenalter nicht möglich. Bis zum Alter von 5 Jahren ist der elterliche BMI prädiktiver als der BMI des Kindes selbst. Ein normgewichtiges Kind im Alter von unter 5 Jahren hat ein über 13-fach erhöhtes Risiko, adipös zu werden, wenn beide Eltern adipös sind. Ein 10-14-jähriges adipöses Kind hat zum Vergleich ein 22-fach erhöhtes Risiko im Erwachsenenalter adipös zu sein, auch wenn beide Eltern normgewichtig sind (Whitaker et al., 1998; Übersicht Yanovski et al., 2001). Der Anteil extrem adipöser Kinder und Jugendlicher nimmt weiter zu (Wabitsch et al., 2002). Die Gründe sind multifaktoriell und bestehen u. a. im modernen Lebensstil (übermäßige Zufuhr von hochkalorischer Nahrung und körperliche Inaktivität), der aufgrund genetischer Prädisposition wirksam wird. Es ist anzunehmen, dass Menschen mit Veranlagung Fettdepots schnell aufzubauen, in Hungerperioden bessere Überlebenschancen hatten. Dieser evolutionäre Vorteil könnte sich jetzt im Zeitalter der freien Verfügbarkeit hochkalorischer Nahrungsmittel zum Nachteil auswirken (Hebebrand und Renschmidt, 1995; Flegal et al., 2002; Friedman, 2003). Roberts et al. (1988) und Ravussin et al. (1988) nennen den reduzierten Energieverbrauch als Hauptfaktor für die Genese des Übergewichts. Roberts et al. (1988) beobachteten dabei Säuglinge von Geburt an bis zum ersten Lebensjahr. Ravussin et al. (1988) belegten die Korrelation von Energieverbrauch und Übergewicht anhand einer zweijährigen Studie an amerikanischen Indianer.

Etwa jeder zweite ist laut der Deutschen Adipositas Gesellschaft (DAG) übergewichtig, jeder fünfte adipös. Adipositas zählt somit zu den häufigsten Krankheiten in den westlichen Industrieländern und nach der Definition der WHO (2000) ist sie als eine chronische Krankheit mit eingeschränkter Lebensqualität und hohem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko zu bewerten. Spätfolgen des kardiovaskulären und respiratorischen Systems sind: rasche Erschöpfung, arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Apoplex, Dyspnoe, Schlafapnoe-Syndrom, etc. Gelenkbeschwerden und Wirbelsäulenprobleme treten durch Überbelastung des Stütz- und Halteapparates und durch verminderte sportliche Aktivität auf (u.a. Calle et al., 2003). Die Anfälligkeit für Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus,

Hyperlipoproteinämie und Hyperurikämie ist erhöht. Psychiatrische Störungen sind bei Jugendlichen mit extremer Adipositas ausgesprochen häufig (Britz et al., 2000). Für die US-Population konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine Zunahme der absoluten BMI-Werte erfolgt, sondern auch die Anzahl der Personen, die wegen ihres Übergewichts stationär behandelt werden müssen, steigt. Ca. 280.000 Todesfälle pro Jahr sind in Amerika der Adipositas und ihren Folgeschäden zuzusprechen, d. h. Adipositas ist die zweithäufigste Todesursache (McGinnis und Foege, 1993; Bray und Tartaglia, 2000). Gelber et al. (2007) wiesen eine lineare Assoziation zwischen höherem BMI und steigendem Mortalitätsrisiko nach. Weltweit wird von einer Zunahme der Adipositas ausgegangen (Dhillon, 2007; Arora und Anubhuti, 2006).

Diese Entwicklung birgt volkswirtschaftliche Risiken, da für die Behandlung der Spätfolgen erhebliche Mittel aufgewendet werden müssen. Die Deutsche Adipositas Gesellschaft verweist darauf, dass die Behandlungen von Adipositas und deren Folgeerkrankungen knapp 5 % der Gesundheitsausgaben der Industrieländer bedingen (DAG).

1.2 Formalgenetische Aspekte des Körpergewichts

Das Körpergewicht ist ein komplexer Phänotyp, der auf Interaktion zwischen Umweltfaktoren und genetischen Prädispositionen beruht (Hebebrand und Remschmidt, 1995; Bell et al., 2000). Erschwert wird die Suche nach genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation dadurch, dass selten eine klassische Mendelsche Vererbung vorliegt und dass es selten monogene Formen der Adipositas gibt. Stattdessen führen Veränderungen in vielen Genen mit jeweils geringem Einfluss auf das Körpergewicht in ihrem Zusammenspiel doch zu weit reichenden Veränderungen des Phänotyps. Es liegt somit ein polygenetischer Phänotyp vor (siehe Abschnitt 1.3.1.3). Weiterhin ist eine genetische Heterogenität anzunehmen, d. h. Mutationen in unterschiedlichen Genen können zum gleichen Phänotyp führen (Hebebrand und Remschmidt, 1995; Holland et al., 1988).

1.2.1 Umweltfaktoren

Zu den bedeutenden Umweltfaktoren zählen: Soziale Schichtzugehörigkeit, Ernährungsgewohnheiten und Freizeitgestaltung (Hebebrand und Remschmidt, 1995). An den Pima-Indianern lässt sich dies gut verdeutlichen: Zur europäischen Mittelalterzeit haben sich die Stammvorfahren der Pima-Indianer in zwei Gruppen aufgeteilt. Die einen wanderten nach

Mexiko aus und betrieben weiterhin Landwirtschaft und Viehzucht. Die anderen zogen in den Süden des Arizonas und stellten sich auf die Lebens- und Ernährungsweise der Nordamerikaner um. Mittlerweile ist in dieser Gruppe fast jeder von ihnen extrem übergewichtig und im Vergleich zu den Pima-Indianern aus Mexiko durchschnittlich 26 kg schwerer (Gibbs et al., 1996).

1.2.2 Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien zum Körpergewicht

Moll et al. (1991) untersuchten bei 284 amerikanischer Schulkindern und deren Eltern den Einfluss der Gene und der Umwelt auf das Verhältnis von Körpergröße und Gewicht. Dabei wurde einem Hauptgen locus 35 % der Varianz im BMI zugesprochen, 42 % polygenetischen Faktoren und nur 23 % Umweltfaktoren. Folglich beruhten in dieser Studie über 75 % der BMI-Varianz auf genetischen Faktoren. In einer von Stunkard et al. (1986) durchgeführten Adoptionsstudie mit 540 erwachsenen Dänen zeigte sich ebenfalls, dass Umwelteinflüsse geringen Einfluss auf den BMI haben. Die 540 Probanden wurden in vier Gewichtsklassen eingeteilt. Es lag ein enger Zusammenhang zwischen der Gewichtsklasse der Adoptierten und dem BMI der biologischen Eltern (für die Mütter $p < 0,0001$ und für die Väter $p < 0,02$). Diese starke Korrelation zum BMI der biologischen Eltern fand sich in allen Gewichtsklassen. Es bestand keine Verbindung zwischen der Gewichtsklasse der adoptierten Kinder zu dem BMI ihrer Adoptiveltern.

Stunkard et al. (1990) führte eine weitere Studie über gemeinsam und getrennt aufgewachsene Zwillinge durch. Unabhängig davon, ob die Zwillingspaare getrennt oder zusammen aufwuchsen, betrug die Intrapaar-Korrelation bei monozygoten Zwillingen, männlich wie weiblich, 70 %. Die Umweltfaktoren, die 30 % der Varianz des BMI erklärten, waren für den jeweiligen Zwilling spezifisch. Der genetische Einfluss fand sich im Bereich des gesamten Gewichtsspektrums.

1.3 Molekulargenetische Aspekte des Körpergewichts

1.3.1 Tiermodelle

1.3.1.1 Monogene Mausmodelle

Mausmodelle belegten schon in den 50er Jahren, dass Adipositas vererbbar sein kann. Dabei beruht Adipositas bis auf einen autosomal dominanten Erbgang (*Agouti yellow*-Maus) auf rezessive Erbgänge (siehe Tabelle 1.3). Zhang et al. (1994) gelang es bei den *obese (ob)*-Mäusen das *ob*-Gen und das dazu homologe humane Gen zu klonen und zu sequenzieren. Das Genprodukt *Leptin* wird fast ausschließlich im weißen Fettgewebe gebildet und ist als Hormon für die Regulation des Körpergewichts von großer Bedeutung. Die Phänotypen der *ob*- und der *diabetes (db)*-Mäuse sind durch eine Verdopplung bis Verdreifachung des Körpergewichts, Diabetes, Hypothermie und Infertilität der Weibchen gekennzeichnet (Hinney et al. 1997b). Der Phänotyp der *Agouti Yellow*-Maus hat gelbes Fell, ist adipös, zeigt eine Insulinresistenz und eine erhöhte Tumorrare auf (Cone et al., 1996).

Erbgang	Mutation	Gen	Genprodukt	Klonierung
autosomal dominant	Yellow	<i>A^y</i>	Agouti-Protein	Lu et al., 1994 Bultmann et al., 1992
autosomal rezessiv	Obese	<i>ob</i>	Leptin	Zhang et al., 1994
	Diabetes	<i>db</i>	Leptinrezeptor	Chen et al., 1996 Tartaglia et al., 1995
	Tubby	<i>tub</i>	Insulin signaling protein	Kapeller et al., 1999 Kleyn et al., 1996 Noben-Trauth et al., 1996
	Fat	<i>fat</i>	Carboxypeptidase E	Naggert et al., 1995
	Fatty liver dystrophy	<i>Lpin 1</i>	Lipin	Peterfy et al., 2001
	Little	<i>Gh</i>	Wachstumshormon	Donahue und Beamer, 1993
	OLETF	<i>Cckar</i>	Cholezystokinin-Rezeptor A	Schartz et al., 1999 Funakoshi et al., 1993
	Mahogan y	<i>Atrn</i>	Attractin	Nagle et al., 1999 Gunn et al., 1999
	Mahogan oid	<i>Mgm 1</i>	Mahogunin	Phan et al., 2002

Tab. 1.3: Übersicht der bekannten Adipositas-Mausmodelle mit monogenem Vererbungsmuster [nach Pérusse et al., 2005]

1.3.1.2 Transgene und KO-Mausmodelle

In knock-out Mausmodellen werden gezielt zentral oder peripher exprimierte Genprodukte ausgeschaltet, um somit Einsicht an deren Beteiligung an z. B. der Gewichtsregulation zu

gewinnen. Bezüglich Adipositas existieren mehrere transgene und KO-Mausmodelle (Übersicht in: York und Hansen, 1997). So führt zum Beispiel eine Melanokortin-4-Rezeptor-Defizienz bei Mäusen zu Adipositas (Huzar et al., 1997). Fehlt der natürlicher Agonist dieses Rezeptors, das Melanozyten-Stimulierende-Hormon (MSH), entwickeln die Tiere einen adipösen Phänotyp (Shimada et al., 1998). Die fehlende hormonelle Stimulans zur Nahrungsaufnahme bei den MSH-defizienten Mäusen bewirkt vermutlich eine erhöhte Nahrungsaufnahme und einen reduzierten Grundumsatz. Des Weiteren gibt es Ergebnisse zu Leptin-defizienten-, Leptin-Rezeptor-defizienten-, MC4-Rezeptor-defizienten und POMC-defizienten Mäusen (Chen et al., 2000; Huzar et al., 1997).

1.3.1.3 Polygene Mausmodelle

Polygene Tiermodelle sollen zur Identifizierung von Genen beitragen, die einen vermutlich kleinen Beitrag zur Adipositas leisten (Pomp, 1997). Mittels Kartierung von so genannten '*quantitative trait loci*' (QTL; Demenais et al., 1988) können diese Gene in Tieren lokalisiert werden. Bei Mäusen sind derzeit 408 QTLs bekannt (Rankinen et al., 2006). Dabei kann jeweils ein bestimmter prozentualer Anteil einer definierten phänotypischen Varianz (z. B. Hautfaltendicke) mit dem entsprechenden QTL erklärt werden (Chagnon et al., 1998). Durch die Identifizierung der den QTLs entsprechenden homologen Regionen können im humanen Genom Regionen nach Genen untersucht werden, die möglicherweise ebenfalls an der Pathogenese der Adipositas beteiligt sind.

1.3.2 Humane Befunde

1.3.2.1 Monogene Formen der humanen Adipositas

Montague et al. (1997) konnten erstmalig den Nachweis für eine monogen bedingte Adipositas beim Menschen erbringen. In der Studie wurde eine Ein-Basenpaar-Deletion in der kodierenden Region des humanen *Leptin*-Gens identifiziert, welche zu einem Frameshift und somit zu einem funktionslosen Hormon führt. Entsprechend dem Tiermodell *ob/ob* Maus (siehe Tabelle 1.3) ist diese Mutation bei homozygotem Auftreten für die extreme Adipositas dreier Kinder ursächlich (Montague et al., 1997). Weitere monogene rezessive Mutationen sind in der Tabelle 1.4 aufgeführt. Allen Mutationen gemeinsam ist eine durch Hyperphagie hervorgerufene frühmanifeste extreme Adipositas (Hebebrand et al., 1998).

Im humanen *Melanokortin-4-Rezeptor*-Gen (*MC4-R*) sind Frameshift-, Missense und Nonsense-Mutationen bekannt, welchen man eine autosomal dominant vererbte Form der menschlichen Adipositas zuspricht (Vaisse et al., 1998; Vaisse et al., 2000; Yeo et al., 1998; Hinney et al., 1999; Hinney et al., 2003; Hinney et al., 2006). Diese Mutationen führen zu einer Haplo-Insuffizienz des *MC4-R*, z. B. durch eine 4 bp-Deletion und somit zu einem verfrühten Stop-Kodon und Abbruch der Translation (Yeo et al., 1998), oder durch eine 4 bp-Insertion zu einem funktionslosen Rezeptor (Vaisse et al., 1998). Hinney et al. (1999) screenen die kodierende Region des *MC4-R* bei adipösen Individuen und beschrieben acht verschiedene Mutationen, die sich nur bei extrem adipösen Indexprobanden fanden. Schätzungsweise haben 2-4 % der extrem adipösen Kinder und Jugendlichen relevante Mutationen im *MC4-R*-Gen (Hinney et al., 1999, Hinney et al., 2003).

Neben den genetisch bedingten Adipositasformen, bei denen Übergewicht als einziger oder dominierender Phänotyp auftritt, existieren in der klinischen Genetik über 50 syndromale Formen der Adipositas. Als Beispiel seien hier das Bardet-Biedl-Syndrom oder das Prader-Willi-Syndrom genannt (siehe Tabelle 1.4).

Erbgang	Gen	Funktion	Beschreibung
monogen rezessive Formen	<i>Leptin (ob)</i>	Deletion führt zu einem Frameshift und damit zu einem funktionslosen Hormon.	Montague et al., 1997
	<i>Leptinrezeptor (db)</i>	Homozygote Mutation führt zu einem verkürzten Leptinrezeptor.	Clement et al., 1998
	<i>Prohormon-Convertase I (PC1)</i>	Compound heterozygot; PC1-Prozessierung wird verhindert.	Jackson et al., 1997
	<i>Pro-opio-melanocortin (POMC)</i>	Ausfall der MSH-Synthese führt zu Adipositas, Nebennierenrindeninsuffizienz, Rothaarigkeit.	Krude et al., 1998 Hinney et al., 1998
monogen dominante Formen	<i>Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)</i>	2 Frameshifts durch Insertion bzw. Deletion von 4 Basenpaaren und 1 Nonsense-Mutation führen wahrscheinlich zu einer Haplo-Insuffizienz des MC4-Rezeptors.	Bsp: Hinney et al., 1999, 2003, 2006; Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998 + 2000 Sina et al., 1999 Farooqi et al., 2000
syndromale Formen	<i>Prader-Willi-Syndrom</i>	Paternale Deletion oder maternale Disomie auf 15q11-q13.	Kuslich et al., 1999 Ohta et al., 1999
	<i>Bardet-Biedl-Syndrom</i>	Mindestens 5 verschiedene Genloci.	

Tab. 1.4: Beispiele für monogene und syndromale Formen der Adipositas beim Menschen [modifiziert nach Pérusse et al., 2005]

1.4 Identifizierung von humanen Genen zur Gewichtsregulation

1.4.1 Genom-Scan

Ein Genom-Scan erlaubt die Identifizierung chromosomaler Regionen, die für einen spezifischen Phänotyp von Bedeutung sein könnten. Hierfür wird das gesamte Genom mit multiallelischen Markern, die in Abständen bis maximal 10 cM von einander entfernt liegen, auf Kopplung durchsucht. Multiallelische Marker können z. B. Mikrosatelliten sein, die aus Di-, Tri-, oder Tetranukleotid-Wiederholungen bestehen. Entgegen klassischen Kopplungsanalysen, verlangen neuere, non-parametrische Verfahren keine Kenntnis über den Erbgang (Lander und Kruglyak, 1995; Risch und Zhang, 1995; Weeks und Lathrop, 1995). Es wird davon ausgegangen, dass Geschwisterpaare, die den gleichen Phänotyp aufweisen, sich bei Vorliegen einer Kopplung auch genetisch ähneln. Der Genom-Scan würde somit chromosomale Regionen identifiziert, in denen z. B. zwei adipöse Geschwister überzufällig häufig, d. h. über 50 %, in den Allelen der untersuchten Mikrosatelliten übereinstimmen. Mit

diesem Ansatz können Kandidatengenregionen und somit darin liegende Kandidatengene identifiziert werden (Hinney et al., 2001).

Hager et al. (1998) konnten beispielsweise mit dem konkordanten Geschwisterpaar-Ansatz auf Chromosom 10 einen Hauptgenloкус für Adipositas identifizieren. Sie untersuchten 158 Kernfamilien (insgesamt 514 Individuen) mittels 380 Mikrosatellitenmarkern auf Kopplung. Die Einschlusskriterien waren: Indexproband mit einem BMI über 40 kg/m² und mindestens ein konkordantes Geschwisterkind mit einem BMI über 27 kg/m². Dieser Kopplungsbefund konnte von Hinney et al. (2005) bestätigt werden.

Weltweit konnten mit Hilfe von Genom-Scans im humanen Genom weitere chromosomale Regionen mit mutmaßlicher Relevanz für den Phänotyp Adipositas identifiziert werden (Übersicht Rankinen et al., 2006).

Es ist zu vermerken, dass dieses methodisch aufwendige Verfahren nur Hauptgenloci detektieren kann. Seltene Allele bleiben unentdeckt. So wäre die Mutation im humanen Leptin-Gen durch diesen Ansatz nicht bemerkt worden.

1.4.2 Kandidatengenansatz

In den letzten Jahren sind mehrere methodische Ansätze entwickelt worden, die helfen sollen relevante Gene zu detektieren (Whittemore, 1996; Lander et Kruglyak, 1995; Lander et Schork, 1994). Beim Kandidatengenansatz werden bereits bekannte Gene auf Assoziation zu einem Phänotyp hin untersucht. Die Plausibilität eines Kandidatengens für einen Phänotyp erschließt sich aus seiner physiologischen Funktion, seinem Expressionsmuster und aufgrund tierexperimenteller Daten (z. B. Genetik, Pharmakologie). Bis Oktober 2005 wurden 426 Studien veröffentlicht, in denen 127 Kandidatengene diskutiert wurden, 22 Kandidatengene wiesen in mindestens fünf Studien positive Ergebnisse auf (Übersicht Rankinen et al., 2006).

1.4.3 Assoziationsstudien

In Assoziationsstudien werden statistische Assoziationen von Phänotyp und Markergenotyp in der Allgemeinbevölkerung geprüft. Hierfür werden Polymorphismen in Kandidatengen als Marker genutzt. Polymorphismen sind Sequenzvarianten mit einer Allelhäufigkeit über 1 % (0,01) in der allgemeinen Population. Die Aussagekraft der Ergebnisse solcher Fall-Kontrollstudien ist entscheidend abhängig von der Wahl der Kontrollgruppen. Fälle und

Kontrollen sollten sich möglichst nur in der Ausprägung der Zielgröße und der mutmaßlichen Ursache unterscheiden; alle weiteren Merkmale sollten identisch sein. Diese schwer zu erfüllenden Voraussetzungen können mit internen Kontrollen umgangen werden, z. B. mit dem familienbasierten Test auf Transmissions-Ungleichgewicht (TDT, Spielmann et al., 1993; Barsh et al. 2000).

1.5 Ghrelin

In dieser Arbeit wurde *Ghrelin* als Kandidatengen im Hinblick auf die Beteiligung an der menschlichen Gewichtsregulierung untersucht. *Ghrelin* ist 1999 von Kojima et al. zuerst beschrieben worden.

1.5.1 Regulierung des Wachstumshormons

Die Hypophyse reguliert hormonell viele Mechanismen im Körper. Der Vorderlappen sezerniert glandotrope Hormone wie Kortikotropin (ACTH), Thyreotropin, follikelstimulierendes Hormon und luteinisierendes Hormon, welche ihrerseits periphere Drüsen zur Hormonsekretion anregen. Weitere Hormone des Hypophysenvorderlappens sind Prolaktin, Melanotropin (MSH) und das Wachstumshormon (growth hormone, GH). Die Hormone des Vorderlappens werden vom Hypothalamus reguliert. Die Neurotropine des Hinterlappens, Vasopressin und Oxytozin, werden im Hypothalamus gebildet und in der Hypophyse gespeichert.

Das Wachstumshormon (GH) wird über zwei hypothalamische Hormone reguliert. Gefördert wird die Produktion und Ausschüttung von dem so genannten Growth-Hormon-Releasing-Faktor (GH-RH), gehemmt wird die Sekretion über Somatostatin. Während Momany et al. (1977) mit Met-Enkephalin-Analoga arbeiteten, entdeckten sie eine Reihe von Hormonen, die auch eine GH-Sekretion fördern, nicht aber zu dem GH-RH gehören. Diese Hormone wurden GH-secretagogues (GHS) oder auch GH-releasing Peptide (GH-RP) genannt. Es wurde eine Reihe von GHS synthetisiert, die sich in ihrer biologischen Aktivität, oralen Bioverfügbarkeit und Rezeptor-Bindungsfähigkeit unterschieden (Ankersen et al., 1999). Von Wichtigkeit erschienen die nicht-peptischen Hormone und somit oral verabreichbaren Hormone L692429 und MK0677 (Smith et al., 1993). Die GHS wirken sowohl an der Hypophyse als auch am Hypothalamus, dort direkt an den somatotropen Zellen (Ankersen et al., 1999). Neben der GH-Sekretion stimulieren GHS auch in geringem Maße die Sekretion

weiterer Hypophysenvorderlappenhormone wie ACTH, Prolaktin, Kortisol und Insulin-Growth-Factor I (Jacks et al., 1994; Locke et al., 1995; Frieboes et al., 1995; Arvat et al., 1995). Die verschiedenen synthetisierten GHS unterscheiden sich in Stärke und Dauer ihrer fördernden Wirkung (Ankersen et al., 1999). Es wird vermutet, dass entweder weitere Rezeptoren und/oder weitere intrazelluläre Funktionswege ausschlaggebend sind.

Howard et al. (1996) haben einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aus der Hypophyse und dem Hypothalamus des Schweins und des Menschen isoliert und kloniert. Dieser Rezeptor stellte sich als GH-Sekretions-Rezeptor (GHSR) heraus. Bei Bindung an den Rezeptor kommt es zur Membrandepolarisierung und zur Ausschüttung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Date et al., 2000). Dieser Funktionsweg lässt die GHS zu funktionellen Antagonisten des Somatostatins werden und stellt mit eigenen Rezeptoren einen alternativen Weg zur Sekretion von GH dar (Kineman et al., 2007). Papotti et al. (2000) sowie Kim et al. (2001) haben in peripheren Geweben fast ubiquitär GHS-Rezeptoren gefunden (Herz, Skelettmuskel, Niere, Lunge, etc.). Im ZNS wurden ausgenommen Neocortex und Cerebellum überall GHS-Rezeptoren detektiert.

1.5.2 Klonierung/ Struktur

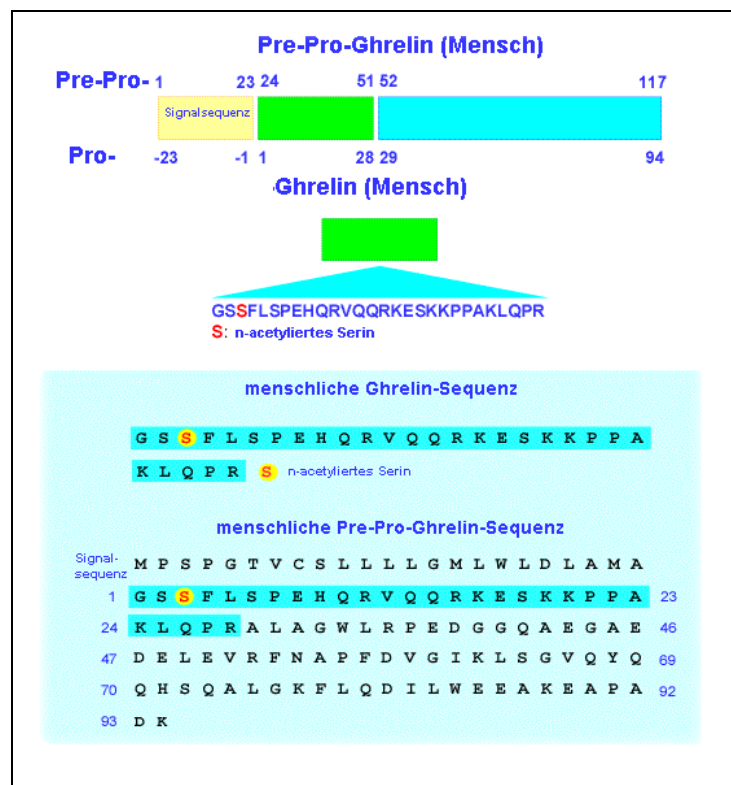


Abb. 1.2: Pre-Pro-Ghrelin. Aminosäuren-Sequenz. Darstellung der Signalsequenz, der Sequenz des biologisch aktiven Ghrelins und der Endsequenz (Phoenix Pharmaceuticals, Inc 2000).

Kojima et al. (1999) konnten aus Rattenmägen den endogenen Liganden für den GHS-Rezeptor klonieren. Der endogene Ligand stimuliert im Gegensatz zu den synthetisch hergestellten GHS an der Hypophyse ausschließlich die Sekretion des Wachstumshormons. Diese Erkenntnis führte zur Namensgebung: *Ghrelin*; ‚Ghre‘ ist das Proto-Indo-Europäische Wort für ‚wachsen‘.

Das Gen liegt auf Chromosom 3 p26-p25 (Scott, 2000). Zwischen den verschiedenen Spezies ist *Ghrelin* hoch konserviert, d. h. das humane *Ghrelin* unterscheidet sich von dem der Ratte nur in 2 AS (auf Position 11 und 12). Das menschlich *Pre-Pro-Ghrelin*, Vorstufe des biologisch aktiven Peptids, ist mit dem der Ratten zu 82,9 % identisch (Kojima et al., 1999).

Pre-Pro-Ghrelin besteht aus 117 AS und umfasst eine 23 AS lange Signalsequenz (AS 1-23), das reife *Ghrelin* (28 AS, AS 24-51) und einen so genannten ‚Schwanz‘ aus 66 AS (AS 52-117; Wajnrach et al., 2000) (siehe Abbildung 1.2). *Ghrelin* besteht aus vier Exons, die eine Länge von 20-117 bp aufweisen und drei Introns mit einer Länge von 194 bp, 2948 bp und 809 bp. Das biologisch aktive *Ghrelin* wird aus den ersten beiden Exons gebildet. Um seine Funktion ausüben zu können, muss das Serin an der 3. AS-Position der hydrophoben Seitenkette n-acetyliert sein (Lányi et al., 2007). Kojima et al. (1999) vermuteten, dass die Acetylierung eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Ghrelin ist das erste bekannte Peptid gewesen, dass nach der Translation eine Acetylierung erfährt und nur so biologisch aktiv sein kann (Kojima et al., 1999; Toshinai et al., 2001).

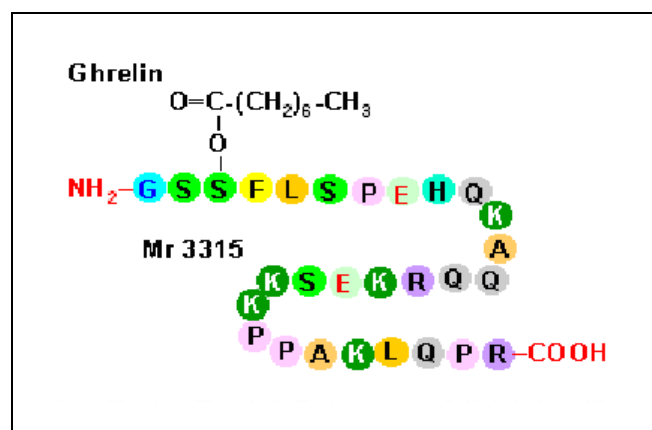


Abb. 1.3: Ghrelin-Peptidsequenz (Kojima et al., 2001)

1.5.3 Expressionsmuster

Ghrelin wird in endokrinen Zellen des Magens, des Magen-Darm-Traktes und des Hypothalamus produziert. Hauptsächlich wird es jedoch in den Epithelzellen des Magens produ-

ziert. In runden, kompakten Granula gespeichert liegt Ghrelin in zwei Formen vor (Toshinai et al., 2001): Zum einen als n-acetyliertes und biologisch aktives Hormon, zum anderen als des-acetyliertes und biologisch inaktives Hormon (Lányi et al., 2007). Die Acetylierung des an der dritten Stelle vorkommenden Serins ist zur Bindung an den Rezeptor notwendig (Kojima et al., 1999). Bei negativem Energiehaushalt konnten Toshinai et al. (2001) darstellen, dass sich das Verhältnis des des-acetylierten zum n-acetylierten von 1,3:1 auf 3:1 zu Gunsten des des-acetylierten Ghrelins verschoben hat. Es ist noch nicht geklärt, ob das des-acetylierte Ghrelin nur einer Vorstufe oder eine metabolisierte Form des n-acetylierten Ghrelins ist und ob während des Fastens die Modifizierung langsamer eintritt oder ob das n-acetylierte Ghrelin schneller sezerniert werden kann (Toshinai et al., 2001). Ghrelin-Rezeptoren waren in der Schilddrüse, Niere, Lunge, im Herz, Skelettmuskeln, Pankreas, in den Adipozyten und in zahlreichen Loci des Hirns bekannt (Papotti et al., 2000; Kim et al., 2001). Kojima et al. (1999) lokalisierten über immunhistochemikalische Analysen Ghrelin in Neuronen des Ncl. arcuatus des Hypothalamus. Nakazato et al. (2001) fanden über c-fos Expressionen GHS-Rezeptoren im gesamten Hirn, ausgenommen dem Neocortex und dem Cerebellum, vor allem aber in den Regionen des Hirns, die an der Regulierung der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Hier ist der hypothalamische Ncl. arcuatus wieder hervorzuheben, der neben dem GHS-Rezeptor auch Rezeptoren für Leptin, NPY und AGRP aufweist.

Da Ghrelin hauptsächlich im Magen produziert wird, sich aber GHS-Rezeptoren auch im Hypothalamus und Hirnstamm befinden, bot Ghrelin die erste mögliche Verbindungsstelle zwischen Magen, Hypothalamus und Hypophyse. Mit dieser Verbindung (vom Magen zu zentralen Zentren der Gewichtsregulation) war Ghrelin nach Leptin ein weiterer peripherer Botenstoff, der möglicherweise ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Pathogenese von humaner Adipositas darstellte (Tassone et al., 2007; Arora und Anubhuti, 2006).

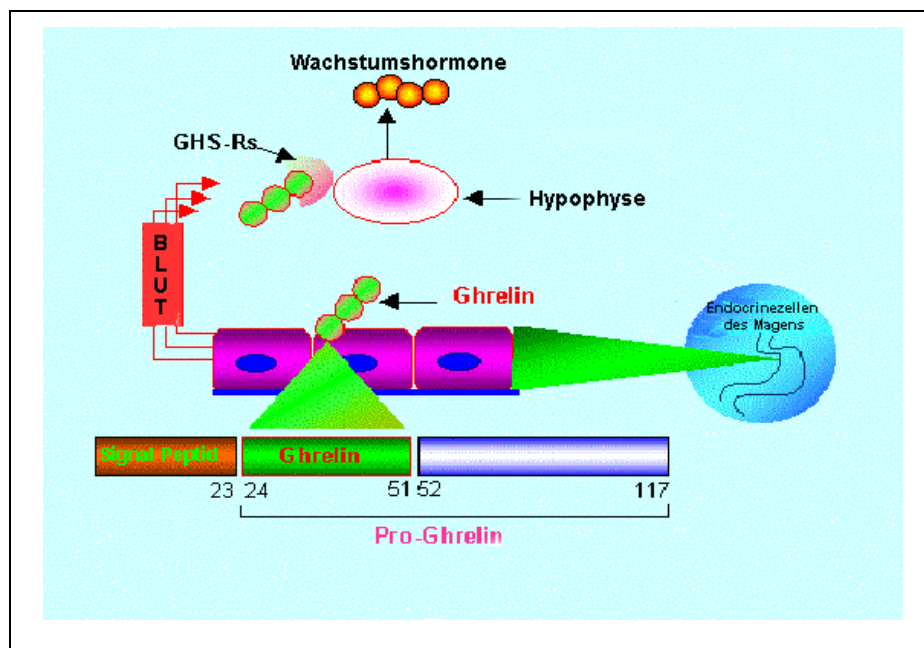


Abb. 1.4: *Synthese, Sekretion und Wirkweise vom Ghrelin vom Magen bis zur Hypophyse (Jung Yang, Phoenix Pharmaceuticals, 1999)*

Im Blut gesunder Menschen zirkuliert Ghrelin mit einer Konzentration von: $117 \pm 37,2$ fmol/ml (Kojima et al., 1999). Ghrelin hat eine sehr kurze Halbwertszeit (Tschöp et al., 2000).

Die Hypothese, dass Ghrelin am Energiehaushalt beteiligt ist, wurde über die Modulation der Synthese und Sekretion von Ghrelin durch die Energiebilanz bestärkt. Eine negative Energiebilanz, z. B. durch Fasten, Insulin- oder Leptingabe, lässt die mRNA-Produktion im Magen und die Plasmakonzentration Ghrelins ansteigen, gleichzeitig sinkt die Konzentration von Ghrelin als Peptid. Gegenseitiges wird bei positivem Energiehaushalt (zum Beispiel Gabe von Glucose oder das Aufheben des Fastens und Wiederaufnahme von Essen) beobachtet: die Plasmakonzentration und mRNA-Produktion sinken (Toshinai et al., 2001; Williams et al., 2006). Bei diätinduzierter Gewichtsabnahme steigt die Ghrelin-Konzentration (Cummings et al., 2002). Gewichtsverlust nach einer Magen-Bypass-Operation führt nicht zu einer höheren Konzentration (Cummings et al., 2002). Die Regulierung der Ghrelin-Konzentration lässt einen anabolen Wirkungsmechanismus Ghrelins vermuten.

1.5.4 Funktion

1.5.4.1 Tiermodelle

Im Gegensatz zu den synthetisch hergestellten GHSR-Liganden bewirkt Ghrelin ausschließlich die Sekretion des Wachstumshormons und nicht wie das GH-RH auch eine Produktion des Wachstumshormons (Date et al., 2000; Kojima et al., 1999). Das erklärt weshalb die GH-sekretionsfördernde Wirkung von Ghrelin bei GH-RH-defizienten Ratten auf lange Sicht nicht mehr nachweisbar ist (Date et al., 2000). Ghrelin benötigt die synthetisierende Wirkung von GH-RH und ergänzt diese auf einem alternativen Weg. Kineman et al. (2007) belegten in einer Studie an Primaten (*Papio anubis*) dass Ghrelin die Ausschüttung des Wachstumshormons effektiver stimuliert als das GH-RH und dass Ghrelin und das GH-RH einen additiven Effekt auf die Ausschüttung haben.

Auch wenn die fördernde Wirkung auf die Wachstumshormon-Sekretion zur Entdeckung von Ghrelin führte, so ist Ghrelins parakrine gastrale Wirkung vom Wachstumshormon unabhängig. Masuda et al. (2000) zeigten, dass Ghrelin die Magensäuresekretion sowie die Magenkontraktion fördert. Diese Wirkungen konnte nicht mit H₂-Blockern (Protonenpumpenhemmer) aber mit Atropin sowie mit bilateraler Vagotomie aufgehoben werden (Masuda et al., 2000). Weiterführend konnte gezeigt werden, dass Ghrelin über vagale Nerven und über Histamin die Magensäureproduktion, Magenentleerung und Magenkontraktion stimuliert (Masuda et al., 2000).

Um die anabole Wirkung Ghrelins zu bestätigen, wurden diverse Mausmodelle durchgeführt: Eine über vermehrte Nahrungsaufnahme und verminderten Fettstoffwechsel induzierte Adipositas konnten Wren et al. (2000) und Zigman et al. (2005) belegen. Nakazato et al. (2001) sowie Shintani et al. (2001) untersuchten die dosisabhängige Zunahme der Nahrungsaufnahme. Anti-Ghrelin-Immuno-globulin-G unterdrückte die Nahrungsaufnahme. Mit der verstärkten Nahrungsaufnahme von GH-defizienten Ratten („*spontaneous dwarf rats*“) belegten Nakazato et al. (2001) und Shintani et al. (2001), dass diese Wirkung Ghrelins unabhängig von der Wachstumshormon-Sekretion war. Wortley et al. (2004) erzeugten Ghrelin-defiziente Mäuse, die lebensfähig waren und einen normalen Wachstumsverlauf sowie ein normales Verhalten bezüglich der spontanen Nahrungsaufnahme zeigten. Über Analysen wurde jedoch nachgewiesen, dass Ghrelin eine besondere Rolle in der Bestimmung des metabolischen Substrates für die Energiegewinnung einnimmt (Fett vs. Kohlenhydrate).

2005 belegten Wortley et al. dass männliche Ghrelin-defiziente Mäuse vor schneller Gewichtszunahme geschützt sind, wenn sie früh fettreicher Nahrung ausgesetzt sind. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Zigman et al. (2005) über ihre GHSR-defizienten Mäuse. Ghrelin konnte in diesen Mäusen weder zu vermehrter Nahrungsaufnahme führen noch eine Aktivität im Ncl. arcuatus bewirken. Diese Mäuse zeichneten sich, weiblich wie männlich, durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme und bevorzugten Verstoffwechselung von Fett vs. Kohlenhydrate aus, zudem durch ein geringeres Körpergewicht und weniger Fettgewebe.

Tschöp et al. (2000) injizierten über zwei Wochen subkutan 2,4 µmol/kg/d synthetisches Ghrelin und erzeugten damit bei den Mäusen eine Gewichtszunahme. Dabei konnte keine Hyperphagie, wohl aber eine Zunahme der Fettmasse und ein reduzierter Fettstoffwechsel festgestellt werden. Da der Respiratorische Quotient angestiegen ist und dieser bei Gabe von GH nicht steigt, erklärten Tschöp et al. (2000) die positiv energiebilanzierende Wirkung Ghrelins wiederum unabhängig von GH.

Couce et al. (2006) und Nakazato et al. (2001) wiesen die Wirkung von Ghrelin vor allem in den Regionen des Hirns nach, welche an der Regulierung der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Der hypothalamische Ncl. arcuatus z. B. weist neben dem GHS-Rezeptor auch Rezeptoren für Leptin, NPY und AGRP auf. Shintani et al. (2001) und Toshinai et al. (2001) beobachteten daraufhin die Wirkung Ghrelins im Zusammenspiel mit Leptin, NPY und AGRP. Ghrelin wurde in den Regelkreislauf des Körpergewichtes mit eingegliedert (siehe Abbildung 1.5). Durch negative Energiebilanzen wird Ghrelin vermehrt synthetisiert und sezerniert. Zentral wirkt Ghrelin dabei stimulierend auf die Sekretion von NPY und AGRP (Nakazato et al., 2001). Die positive Energiebilanz, die Ghrelin über reduzierte Fett- und verstärkte Kohlehydratverwertung sowie durch Hyperphagie erreicht, wird, wenn nicht ganz, dann zumindest zum Teil, durch die Sezenierung und Wirkung von NPY und AGRP hervorgerufen. Über Anti-NPY-, Anti-AGRP- oder Anti-alpha-MSH-Immunglobuline stieg die durch Ghrelin geförderte Nahrungsaufnahme nicht an (Nakazato et al., 2001). Shintani et al. (2001) zeigten, dass Leptin die Wirkung von Ghrelin reduziert, gleichermaßen Ghrelin aber auch die Wirkung von Leptin abschwächt. Die inhibitorische Wirkung Leptins auf NPY wird durch Ghrelin unterbunden.

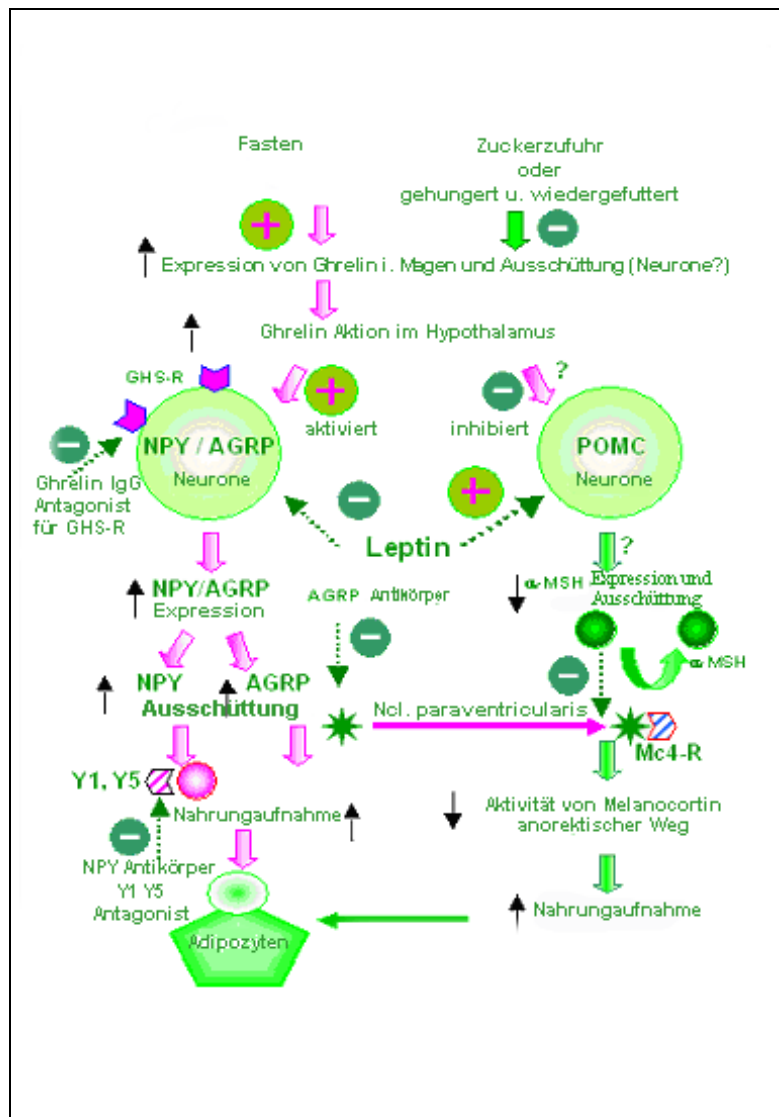


Abb. 1.5: Ghrelins Interaktion mit Leptin, NPY, AGRP, POMC und Alpha-MSH (Phoenix Pharmaceuticals, Inc 2001)

1.5.4.2 Befunde beim Menschen

Takaya et al. (2000) untersuchten die Wirkung Ghrelins bezüglich der GH-Sekretionsrate an vier gesunden Männern. Sie konnten eine dosisabhängige GH-Ausschüttung belegen, die stärker war als es durch GH-RH bekannt war. Die Wirkung auf ACTH und Prolaktin war minimal. Für das luteinisierende Hormon, das follikelstimulierende Hormon und Thyreotropin konnte keine veränderte Serumkonzentration nachgewiesen werden (Takaya et al., 2000).

Ghrelin wurde als Kandidatengen auf dessen Beteiligung an der menschlichen Gewichtsregulation und Adipositasentwicklung analysiert, nachdem das Expressionsmuster in einem möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese von Adipositas gestellt werden konnte

und es unter täglicher Ghrelingabe zu einer Gewichtszunahme bei Mäusen kam (Tschöp et al., 2000).

Eine mögliche Beteiligung Ghrelins an der Pathogenese humaner Adipositas wurde als erstes von Tschöp et al. (2001) untersucht. Dabei wurden 15 Kaukasier mit 15 Pima Indianern und innerhalb der Populationen noch einmal adipöse mit nicht-adipösen Probanden verglichen. Die von Tschöp et al. aufgestellte Hypothese, dass adipösen Probanden erhöhte Ghrelin-Plasmaspiegel aufweisen und somit Ghrelin eine mögliche Erklärung für Adipositas darstellt, konnte nicht belegt werden. Sowohl innerhalb der Gruppen (Kaukasier-Gruppe und Pima Indianer-Gruppe) als auch im gesamten Probandenkollektiv hatten Adipöse stets niedrigere Plasmaspiegel als Nichtadipöse. Der Konzentrationswert korrelierte negativ mit dem BMI, der Fettmasse und dem Körpergewicht. Zudem bestand eine negative Korrelation zum Plasmakonzentrationspiegel von Insulin und Leptin. Die niedrige Ghrelin-Konzentration bei Adipösen kann zum einen durch erhöhte Insulin- und Leptinspiegel bedingt sein. Zum anderen kann es auch eine physiologische Anpassung des Körpers auf die positive Energiebilanz darstellen (Tschöp et al., 2001).

Dass der Plasmaghrelinspiegel ein Resultat der Energiebilanz darstellt, belegten weitere Studien: Otto et al. (2001) wiesen bei Patienten mit Anorexia nervosa einen höheren Plasmaspiegel nach, der bei Gewichtszunahme sank. Hansen et al. (2002) wiesen bei adipösen Patienten einen niedrigeren Spiegel als bei Normalgewichtigen auf, der bei Gewichtsabnahme stieg.

Cummings et al. (2001) postulieren bei einem beobachteten präprandialen Ghrelin-Konzentrationsanstieg, dass Ghrelin der Auslöser zur Nahrungsaufnahme ist.

Ferner untersuchten Cummings et al. (2002) die Ghrelin-Plasmaspiegel bei Gewichtsabnahme nach Diät bzw. nach einer Magen-Bypass-Operation. Die Ghrelin-Konzentration stieg erwartungsgemäß bei diätinduzierter Gewichtsabnahme und fiel markant bei einer Gewichtsabnahme nach Magen-Bypass. Dieses Ergebnis lässt sich mit der Erkenntnis, dass Ghrelin hauptsächlich im Magen gebildet (Tschöp et al., 2000) wird, erklären.

Ghrelin wurde auch im Zusammenhang mit Syndromen, die einen adipösen Phänotyp aufweisen, untersucht. Delparigi et al. (2002) verglichen sieben Patienten mit Prader-Willi-Syndrom mit 30 gesunden Probanden hinsichtlich ihrer Ghrelin-Plasmakonzentration während einer Fastenperiode; ihrer Körpermasse (Wasser, Muskulatur, Fett) und ihres

subjektiven Hungergefühls. Probanden mit Prader-Willi-Syndrom hatten einen höheren Ghrelin-Plasmaspiegel als die Kontrollgruppe. Es bestand eine positive Korrelation zwischen dem subjektiven Hungergefühl und der Ghrelin-Plasmakonzentration. Höhere Ghrelin-Plasmakonzentration konnte auch Haqq et al. (2003) bei 13 Probanden mit Prader-Willi-Syndrom verglichen mit 17 Probanden mit gleichem BMI feststellen. Die Hyperphagie beim Prader-Willi-Syndrom könnte folglich über das durch die Wirkung Ghrelins erhöhte Hungergefühl erklärbar sein.

2 Probandenkollektiv und Material

2.1 Probandenkollektiv

2.1.1 Rekrutierung des Probandenkollektivs

Jeder Proband wurde über die Studie anhand eines Informationsblattes aufgeklärt und unterzeichnete eine Einverständniserklärung. Bei Minderjährigen wurde diese von mindestens einem Erziehungsberechtigten eingeholt. Mit den Probanden und gegebenenfalls ihren Eltern wurden Interviews zur Gewichtsanamnese, Essverhalten und organischen Erkrankungen durchgeführt; zusätzlich wurden soziodemographische Daten aufgenommen. Zur Erfassung möglicher Essstörungen wurde für das Essverhalten das Composite International Diagnostic Interviews (CIDI, Sektion Essstörungen; WHO, 1990) eingesetzt. Die personenbezogenen Daten wurden verschlüsselt und gemäß dem gültigen Datenschutzgesetz verwahrt. Das Studienkonzept wurde von der Marburger Ethikkommission gebilligt.

Die Probanden wurden an verschiedenen Orten der Bundesrepublik rekrutiert (Hinney et al., 1997a):

- Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA, Berchtesgaden (Langzeittherapie für Jugendliche mit extremer Adipositas): adipöse Probanden.
- Klinische Forschergruppe an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Philipps- Universität, Marburg: normal- und untergewichtige Studenten.
- Spessart Klinik, Bad Orb (Rehabilitationsklinik für Kinder und Jugendliche): adipöse Probanden.
- Klinik Hochried, Murnau (Spezialklinik zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas): adipöse Probanden.
- Universitätskinderklinik, Ulm: adipöse Probanden
- Universitätskinderklinik, Gießen: adipöse Probanden

2.1.2 Voraussetzungen für die Aufnahme in die Studie

Für die Aufnahme in die Studiengruppen mussten alle Probanden folgende Voraussetzungen erfüllen:

- keine organische Erkrankungen, die das Körpergewicht beeinflussen könnten
- keine Dauermedikation, die Auswirkung auf das Körpergewicht hat
- Nikotinkonsum unter 10 Zigaretten pro Tag
- adipöse Probanden : BMI ≥ 90 . Altersperzentile
 - frühmanifeste und extreme Adipositas
- untergewichtige Probanden: BMI ≤ 15 . Altersperzentile
- normalgewichtige Kontrollen: BMI ≥ 30 . Altersperzentile und ≤ 69 . Altersperzentile

2.1.3 Studiengruppen

Die Studiengruppen sind nach Gewichtsklasse, Geschlecht, durchschnittlichem BMI und durchschnittlichem Alter in der folgenden Tabelle 2.1 aufgeführt.

Studiengruppe	Geschlecht (Anzahl)	durchschnittl. BMI-Perzentile	durchschnittl. BMI (kg/m ²)	durchschnittl. Alter (Jahre)
adipöse Kinder und Jugendliche [°]	weibl. (n = 127) männl. (n = 88)	100	39,78 +/- 5,29	15,27 +/- 2,38
normalgewichtige Studenten [°]	weibl. (n = 35) männl. (n = 41)	48,57	21,84 +/- 1,05	24,8 +/- 2,62
normalgewichtige Erwachsene *	weibl. (n = 20) männl. (n = 24)	52,46	24,46 +/- 1,69	42,56 +/- 6,93
untergewichtige Studenten *	weibl. (n = 60) männl. (n = 74)	3,69	18,27 +/- 1,16	25,01 +/- 3,59

Tab. 2.1: Deskriptive Darstellung der Studiengruppen, [°] initiale Studiengruppe, *erweiterte Studiengruppe

2.1.4 Untersuchungsgut

Als Untersuchungsgut diente aus EDTA-Blut extrahierte DNA.

2.2 Material

2.2.1 Verwendete Großgeräte

In der folgenden Tabelle 2.2 werden die verwendeten Großgeräte mit ihrer Typenbezeichnung und den Herstellern aufgeführt.

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Analyse-Waage	SBC 51	Scaltec
Automat. Sequenziergerät	ABI Sequenzer 377	ABI
Eismaschine	AS-10	Scotsman
Elektrophoresekammer	Maxi Gel System	Owl- Scientific
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Stromaggregate für Horizontalelektrophorese	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply E452 und E 734	Stromaggregate für Horizontalelektrophorese	Consort
Geltrockner mit Zeitschaltuhr, Öldrehschieberpumpe und Kältefalle	Uni geldryer 4050	Uniequip
Gradientenzykler	Uni cryo MC 2L – 60°C Multiblock System MBS 0,2G	Hybaid Ltd.
Kamera	Digitales Videosystem	Polaroid
Kühlzentrifuge	Megafuge 2.0 R	Heraeus
Magnetrührer	IKAMAG RH	IKA-Works Inc.
Mikrowelle	Mikrowelle	Panasonic
pH-Meter	Labor-pH-mV-Meter pH 525	WTW
Photometer	GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Pipetten		Eppendorf / Finn
Reinstwasseranlage	MiliQplus	Milipore
Schüttelwasserbad	1083 GFL	GFL
Sequenziergerät	LiCor 4200-2	MWG Biotech
SSCP-Kammern	SE 600 series	Hoefer Scientific Instruments
Thermozykler groß	Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer
Thermozykler klein	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermozykler, dreifach	Touchdown	Hybaid Ltd.
Tischzentrifuge	Laborfuge 400 E	Heraeus
Tischzentrifuge	Biofuge13	Heraeus
Transilluminator	Mighty Bright, UV-TM-25	Hoefer Scientific Instruments
Vortex-Schüttelgerät	MINI Schüttler MS 1	IKA-Works Inc.
Wipp-Schüttler	Duomax 1030	Heidolph

Tab. 2.2: Verwendete Großgeräte

2.2.2 Chemikalien

In der folgenden Tabelle 3.3 werden die verwendeten Chemikalien mit ihrer Bezugsquelle aufgeführt.

Chemikalien	Bezugsquelle
123 bp-Marker	Gibco BRL
2'Propanol (Isopropanol)	Riedel-de-Haen
Acrylamid-Bis-Acrylamid (37,5:1)	Roth
Agarose NEE0	Roth
Ammoniumperoxidsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Amersham Pharmacia Biotech
Aqua ad injectabile	Braun
Borsäure	Riedel-de-Haen
Bromphenol blau	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA-Polymerisationsmix (dNTP)	Amersham Pharmacia Biotech
Essigsäure $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2)$	Riedel-de-Haen
Ethanol, absolut	Riedel-de-Haen
Ethanol, vergällt 100 %	Apotheke
Ethidiumbromid	Roth
Ethylenediamin-tetraaceticacid $2\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA)	Roth
Ficoll (Type 400)	Pharmacia Biotech
Formaldehyd 37 %	Merck
Formamid	Sigma
Glycerol	Sigma
HPLC-Wasser	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma
Natriumcarbonat (NaCO_3)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
PCR-Puffer (10x) (magnesiumfrei)	Sigma
Puffer B^+	Fermentas
Puffer Y^+ /Tango TM (mit BSA)	Fermentas
Salpetersäure (HNO_3)	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Silbernitrat (AgNO_3)	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
TEMED $(\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2)$	Sigma
TrisHCL	Roth
Xylene-Zyanol blau	Merck

Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen

2.2.3 Puffer

Alle verwendeten Lösungen wurden mit *aqua bidest.* angesetzt und, wenn nicht anders erwähnt, anschließend autoklaviert. Die hierfür verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad per analysis und wurden von folgenden Firmen bezogen: Fermentas und Sigma.

Puffer zur DNA-Extraktion	Reagenzien	Konzentration	g/1000ml Aqua dest.
Red cell lysis buffer (RCLB) (pH 7,6)	TrisHCL	10 mM	1,58
	MgCl ₂	5 mM	1,02
	NaCl	10 mM	0,58
SE-Puffer (pH 8,0)	NaCl	75 mM	4,39
	NaCl ₂ EDTA	25 mM	8,41
TE-Puffer (pH 8,0)	TrisHCL	10 mM	1,21
	EDTA	1 mM	0,34
Puffer zur Gelelektrophorese	Reagenzien	Konzentration	Menge
1 x TAE-Puffer (pro Liter)	Tris	0,04 M	242,0 g
	Essigsäure/Eisessig	100 %	57,0 ml
	EDTA (pH 8,0)	0,5 M	100,0 ml
Gellandungspuffer	Ficoll (Type 400)	15.00 % (w/v)	} 1-2 µl
	Bromphenolblau	0.25 % (w/v)	
	Xylencvanol	0.25 % (w/v)	
Puffer für SSCP	Reagenzien	Konzentration	Menge (für ein Gel)
10 x TBE-Puffer pH = 8	Tris/HCl		108,0 g/l
	Borat		55,0 g/l
	EDTA	0,5 M	8,3 g/l
Probenpuffer	EDTA	0,5 M	8,0 ml
	Formamid	deionisiert	40,0 ml
	Glyzerin		2,0 ml
	Bromphenolblau		50,0 mg
	Xylen Zyanol		50,0 mg
	Aqua bidest		auf 200 ml auffüllen
Puffer zur RFLP	Bezugsquelle	Enzym	
⁺ / Tango	Sigma/ Fermentas	<i>SacI</i>	
B ⁺	Sigma/ Fermentas	<i>BseNI</i>	

Tab. 2.4: Puffer zur DNA-Extraktion, Gel-Elektrophorese, SSCP und RFLP für Ghrelin

2.2.4 Enzyme

In der folgenden Tabelle 2.5 werden die verwendeten Enzyme mit ihrer Bezugsquelle aufgeführt

Enzym	Bezugsquelle
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Sigma
Pronase E	Sigma
<i>SacI</i>	Fermentas
<i>BseNI</i>	Fermentas

Tab. 2.5: Verwendete Enzyme und ihre Bezugsquellen für Ghrelinanalysen

2.2.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der genomischen Sequenz (acc.no.: AF296558; NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Wajnrajch et al., 2000) hergeleitet. Die Sequenzen der Primer sind in Richtung 5'→3' angegeben. Mit F und R wurden die vorwärts bzw. rückwärts gerichteten Primer gekennzeichnet.

Primerpaar	forward Primer	reverse Primer
GHR-1	GHR-1-F	GHR-1-R
	CTG CCT GGA GAC CCT CTC T	AAC AAC ATG TGG GGC TTT GT
GHR-2	GHR-2-F	GHR-2-R
	AGG ACA TGG GGG CTT AGA GT	GCT GCC ACA GAA GCA TAA
		AA
GHR-3	GHR-3-F	GHR-3-R
	TGA CCT CTG ACA TCT CCT GG	GAA ACC GAG CAA ACC CAG T
GHR-4	GHR-4-F	GHR-4-R
	GGT GCA CCC AGC ATT CTT AC	AGC CAG ATG AGC GCT TCT
		AA
ARMS	GHR-3-iF	GHR-3-oR
GHR-3-T- Allel	GAA TCA AGC TGT CAG GGG TCC T	GCA GAT CTT TGG GAA AGG GAA A
ARMS	GHR-3-oF	GHR-3-iR
GHR-3-A- Allel	GAG CTG TGG TCC TGA GAA AGG A	GGC TGT GCT GCT GGT GCT

Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide für Ghrelin (Exon 1-4)

3 Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Die DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll der Aussalzungsmethode von Miller et al. (1988) isoliert. Dazu verwendeten wir EDTA-Blut. EDTA verhindert die Koagulation von Blut. Um die Zellbestandteile zu lysieren, wurden zu den 10-20 ml EDTA-Blut 30 ml eiskalter Erythrozyten-Lysepuffer (RCLB, siehe Tabelle 2.4) hinzugegeben. Während der 15 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Mix 3-4 x durchmischt. Anschließend zentrifugierte man 10 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (3300 Umdrehungen pro Minute; Ausschwingrotor, Heraeus Kühlzentrifuge). Der Überstand wurde abgegossen. Das Sediment, das Zellkerne und Mitochondrien mit der DNA enthält, wurde zuerst mit etwas RCLB aufgenommen, um dann mit weiterem RCLB auf 30 ml aufgefüllt zu werden. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben erwähnt) nahm man das neu entstandene Sediment in 5,5 ml Pronase-Reaktionsmix (siehe Tabelle 3.1) auf. Über Nacht baute die Pronase im Wasserbad bei 37°C (Schüttelwasserbad, GFL) die in der Lösung enthaltenen Proteine ab.

Am nächsten Morgen wurden 5 ml SE-Puffer in die Lösung gegeben und diese für 10 min bei 55°C ins Schüttelwasserbad gestellt. Zur anschließenden Proteinfällung pipettierte man 2,5 ml 5 M NaCl-Lösung hinein und vortexte es sofort für 15 Sekunden (IKA-Works, MINI Schüttler). Nach 10 minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C (Heraeus, Megafuge) setzten sich die Proteine ab. Der Überstand, der die DNA enthält, konnte abgenommen werden. Die DNA wurde durch Zugabe von 2,5-fachem Volumen Ethanol gefällt und schwamm an der Oberfläche. Mit einem Haken (Pasteurpipette mit zugeschmolzener Spitze) wurde die DNA herausgefischt. Sie wurde kurz in 70%igem Ethanol geschwenkt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (pH 8,0, siehe Tabelle 2.4) aufgenommen. Die DNA löste sich entweder bei 4°C über Nacht auf dem Wipp-Schüttler (Heidolph, Rotor Duomax 1030) oder während 1-2 Stunden bei 50°C im Wasserbad.

Lagen viele kleine DNA-Bruchstücke vor, musste alternativ verfahren werden: Die Lösung wurde direkt nach der Fällung für 20 min bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit erneut zentrifugiert (Heraeus, Megafuge). Die DNA setzte sich auf dem Boden des Falcons ab und der Überstand konnte abgegossen werden. Im Anschluss wurde 1,5 ml 70%iges Ethanol zur DNA dazugegeben, um beides gemeinsam in ein Eppendorf Cup zu

überführen. Das Gemisch wurde bei 14000 rpm zentrifugiert (Heraeus, Laborfuge 400E). Nachdem das Ethanol entfernt worden ist, sollte das Pellet, das die DNA enthält, kurz an der Luft trocknen und dann, wie oben beschrieben, in TE-Puffer gelöst werden.

Einzelprobe	
SE-Puffer	5 ml
Pronase 10 mg/ml (in aqua dest.)	25 µl
SDS	500 µl

Tab. 3.1: Pronase-Reaktionsmix

3.1.1 DNA-Verdünnung

Die Menge und damit auch die Konzentration der DNA, die aus den verschiedenen Blutproben gewonnen werden konnte, differierte in hohem Maße und musste daher photometrisch bestimmt werden (Pharmacia Biotech, Gene Quant II). Die im TE-Puffer gelöste DNA wurde 1:200 mit *aqua destillata* verdünnt. Anschließend bestimmte man die Extinktion dieser Lösung nochmals im Photometer. Folgende Formel diente zur Berechnung der Konzentration:

$$\text{DNA-Konzentration (}\mu\text{l/ml)} = \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Extinktionswert bei 260 nm.}$$

Die DNA Konzentration sollte sich zwischen 300 und 1000 µg/ml bewegen. Das Verhältnis zwischen DNA und Protein sollte bei ca. 1,5 liegen. Ist der Quotient niedriger, muss man von einer Eiweißverunreinigung ausgehen. Liegt ein höherer Quotient vor, ist die Probe wahrscheinlich mit RNA verunreinigt.

Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die DNA mit *aqua bidest* auf 100 ng/µl verdünnt. Sowohl die Verdünnung als auch die Ursprungslösungen wurden bei -80°C tiefgefroren.

Anmerkung

Ich habe nur einen Teil der untersuchten Blutproben selbst extrahiert. Zum großen Teil konnte ich auf vorhandene Bestände der Klinischen Forschergruppe zurückgreifen.

3.1.2 Herstellung von Mikrotiterplatten

Mikrotiterplatten für maximal 96 DNA-Proben wurden hergestellt, um das Pipettieren während des Screenings zu erleichtern. In jedes Well legte man je 25 µl *aqua ad injectabilia* vor und gab je 6 µl der verdünnten DNA (100 ng/µl) dazu. Bei einer DNA-Verdünnung von 10 ng/µl konnte man direkt 30 µl DNA in die Wells auftragen. Die DNA-Endkonzentration in den Wells betrug etwa 20 ng/µl. Die Lagerung der Mikrotiterplatten erfolgte bei -80°C.

3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.1 Allgemeines zur PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und vielseitige *in-vitro* Methode, um eine beliebige DNA-Sequenz auf ein Vielfaches zu vermehren.

Mullis et al. (1987) haben diese Methode bei der Firma Cetus in Kalifornien entwickelt. Seitdem ist sie optimiert und vollständig automatisiert worden. Sie gehört zu einer Routinetechnik im molekularbiologischen Labor.

Um eine PCR durchführen zu können benötigt man folgende Grundkomponenten: eine DNA-Matrize, DNA-Polymerase, vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTPs) und speziell für das ausgewählte DNA-Fragment synthetisierte Oligonukleotide (Primer).

Als Ausgangsmaterial für eine PCR verwendet man DNA oder cDNA. Von dem zu untersuchenden Zielfragment müssen zumindest die Sequenzen der flankierenden Enden bekannt sein. Entsprechend dieser Sequenzen stellt man zwei Primer her. Primer sind kurze, 15 bis 30 bp große, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden der Zielsequenz sind (Ehrlich, 1989). Sobald die DNA denaturiert ist, setzt der eine (forward) Primer am 5' Ende des Zielfragmentes und der andere (reverse) Primer am 3' Ende an. Anhand der Matrize wird mit Hilfe der DNA-Polymerase am 3' Ende der beiden Primer die komplementären dNTPs eingebaut. So entsteht eine Kopie der Zielsequenz. Üblicherweise wird die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Sie wurde ursprünglich aus einer heißen Quelle des Yellowstone Nationalparks isoliert (Schimmel, 1990). Ihre optimale Arbeitstemperatur liegt zwischen 70-80°C. Bei dieser Temperatur liegt die durchschnittliche Einbaurrate bei 35-100 Nukleotiden pro Sekunde (Newton, 1997). Die Konzentration der dNTPs ist abhängig von der

Fragmentlänge und der Zyklenanzahl. Nukleotide müssen einen Komplex mit Magnesiumchlorid (MgCl_2) eingehen, um eingebaut werden zu können. MgCl_2 fördert zudem das Anlagern der Primer an die DNA und stimuliert die Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase. Ist die MgCl_2 -Konzentration zu hoch, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Diese unspezifischen Amplifikate können auch bei zu hoch gewählter Zyklenanzahl auftreten (Newton, 1997).

Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR muss eine Verunreinigung mit ‚fremder‘ DNA verhindert werden. Um einen verunreinigten PCR-Ansatz identifizieren zu können, gehört zu jedem Ansatz eine Wasserprobe. Bei der Wasserprobe, auch Negativkontrolle genannt, wird anstelle der Menge DNA Wasser eingesetzt. Erscheint auf dem Agarose-Gel im Anschluss eine Bande, so muss die gesamte Versuchsreihe verworfen werden (Newton, 1997).

Ein PCR-Zyklus besteht aus folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung: Das Gemisch wird in diesem Schritt zwischen 85-100°C erhitzt. Dabei wird die komplexe, doppelsträngige DNA vollständig denaturiert und liegt am Ende des Schrittes einzelsträngig vor.

2. Annealing (Anlagerung der Primer): Je nach Primerzusammenstellung wird das Gemisch zwischen 60-75°C heruntergekühlt. Die optimale Temperatur (T_m) der jeweiligen Primer lässt sich nach folgender Faustformel berechnen (Mullis et al., 1987):

$$T_m = (\text{Anzahl der G-C Bindung}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl der A-T Bindungen}) \times 2^\circ\text{C}$$

In diesem Schritt lagern sich die Primer an die komplementären Stellen der DNA-Matrize an.

3. DNA-Synthese: Die Temperatur richtet sich in diesem Schritt nach der T_m der eingesetzten DNA-Polymerase. Für die *Taq*-DNA-Polymerase liegt sie bei 72 °C (Newton, 1997).

Die Dauer der einzelnen Schritte liegt zwischen 30 Sekunden und einer Minute, sie werden zyklisch etwa 30 Mal wiederholt. Im 1. Zyklus werden 2 neue Stränge gebildet, die noch nicht der gewünschten Ziellänge entsprechen. Ab dem 3. Zyklus wird hauptsächlich die definierte Fragmentlänge synthetisiert. Die DNA-Kopien vermehren sich während einer PCR exponentiell. Genauer lässt sich die Kopienanzahl wie folgt berechnen:

$$\text{Kopienzahl} = (2^n - 2n) \times X \quad (\text{Strachan et Read, 1996})$$

[n = Anzahl der Zyklen, $2n$ = Produkt aus dem 1. und 2. Zyklus, wo die Länge noch nicht definiert ist, X = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize]

Das PCR-Produkt wird erst auf 4°C abgekühlt und danach auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Bei -20°C hält es sich das PCR-Produkt gegebenenfalls über mehrere Wochen.

3.2.2 Optimierung der PCR

Bevor man das Probandenkollektiv mit neuen Primern untersuchte, mussten die PCR-Bedingungen optimiert werden.

Zuerst trugen wir die Primer-Stocklösungen auf ein Agarose-Gel auf, um über die Leuchtintensität die endgültige Verdünnung der Primer bestimmen zu können. Im nächsten Schritt wurden die gewonnenen Primer-Verdünnungen wieder auf ein Agarose-Gel aufgetragen und erneut konnten wir über die Leuchtintensität die Menge der Primer bestimmen, die für das PCR-Rezept ausgewählt wurde.

Das PCR-Rezept testeten wir beim ersten Durchgang mit zwei Variablen aus. Eine Variable war die Annealing-Temperatur. Mit Hilfe des Gradientencyclers (Hybaid Ltd., Multiblock System MBS 0,2G) konnte man eine Spanne von 15°C abdecken, d. h. pro Reihe unterschied sich die Annealing-Temperatur um ca. 1°C. Somit konnten pro PCR-Ansatz bis zu 12 verschiedenen Annealing-Temperaturen gleichzeitig getestet werden. Den mittleren Wert der 15°C-Spanne legte man in die Nähe der gemittelten T_m beider Primer. Die zweite Variable in der Optimierung betraf die Magnesiumchlorid-Konzentration. Die $MgCl_2$ -Stocklösung lag in einer Konzentration von 25 mM vor. Wir variierten zwischen einer hohen Konzentration von 3,5 μM und mit einer niedrigen Konzentration von 1,5 μM . Zu niedrige Konzentration kann die *Taq*-Polymerase inaktivieren, eine zu hohe Konzentration kann die Bildung unspezifischer DNA-Amplifikate fördern (Newton, 1997).

Nach dem ersten Durchgang der Optimierung wurde anhand der Ergebnisse auf dem Agarose-Gel die beste $MgCl_2$ -Konzentration sowie die beste Annealing-Temperatur ausgewählt.

War die Quantität des PCR-Produktes zu niedrig, wurde die *Taq*-Konzentration, die Primer-Konzentration, oder die Zyklenanzahl im zweiten Durchgang erhöht. Allgemein wurde eher die *Taq*- oder Primer-Konzentration erhöht, da bei höheren Zyklenanzahlen die akkumulierten Produkte zu einer Attenuation der Amplifikation führen (Plateau-Effekt, Stolovitzky et

Cecchi, 1996). Die Primer-Konzentration wurde reduziert, wenn starke Primerbanden zu erkennen waren. Zudem birgt eine zu hohe Primer-Menge das Risiko für den Erhalt von unspezifischen PCR-Produkten.

DNA-Regionen mit stabiler Sekundärstruktur oder sehr hohem G/C-Gehalt lassen sich oft nur mit hohem Hintergrund amplifizieren. Die Verwendung von denaturierenden Agenzien, wie Dimethylformamid (DMSO, Hung et al., 1990), Formamid (Sarkar et al., 1990), Glycerin oder 7-deaza-GTP, bewirken eine vollständige Strangtrennung der DNA, sodass diese der Amplifikation zugänglich gemacht werden kann. Durch den Zusatz von Tetramethylammoniumchlorid (Scheinert et al., 1997) lässt sich die Amplifikation von besonders A/T-reichen DNA-Regionen verbessern. Rinderserumalbumin (BSA) wirkt als unspezifischer Enzymstabilisator und vermag PCR-Inhibitoren wie EDTA, Heparin oder SDS zu binden (Pääbo et al., 1988).

3.2.3 Spezielle PCR-Rezepte für *Ghrelin* Exon 1-4

Die Primer-Verdünnungen waren bei allen Primern mit 2,5 µl der Stocklösung auf 97,5 µl Braunwasser gleich: 0,1-0,2 µM. Je 2,5 µl DNA wurden in die Tubes vorgelegt.

In der folgenden Tabelle 3.2 werden die Rezepte für die jeweiligen Exons und für die ARMS aufgeführt.

Exon	Primer-F	Primer-R	H ₂ O	Puffer*	MgCl ₂	dNTP	Taq
GHR-1	0,3	0,3	17,55	2,5	1,5	0,25	0,1
GHR-2	0,3	0,2	17,65	2,5	1,5	0,25	0,1
GHR-3	0,2	0,3	15,65	2,5	3,5	0,25	0,1
GHR-4	0,2	0,3	15,65	2,5	3,5	0,25	0,1
GHR-3-ARMS	0,25 (iF)	0,25 (iR)	16,35	2,5	2,5	0,25	0,2
	0,08 (oF)	0,008 (oR)	16,35	2,5	2,5	0,25	0,2

Tab. 3.2: Spezielle PCR-Rezepte für *Ghrelin* (Exon 1-4); Alle Angaben in µl; *Puffer (Sigma, ohne MgCl₂)

Die Thermocycler-Bedingungen (siehe Tabelle 3.1) für die Primerpaare GHR-1 & -2 unterschieden sich von den Bedingungen für die Primerpaare GHR-3 & -4 lediglich in der Annealing-Temperatur.

Die Tabelle 3.3 zeigt die Thermocycler-Einstellungen der vier Exons.

Zyklen	Minuten	Exon	Temperatur in °C
	5	alle	94
30	0,5	alle	94
30	0,5	GHR-1&-2	61
		GHR-3&-4	63
		GHR-3-ARMS	63
30	0,5	alle	72
	5	alle	72
	unendlich	alle	4

Tab. 3.3: Thermocycler-Bedingungen für die PCR von Ghrelin (Exon 1-4)

Bevor 20 µl des PCR-Mixes in die Taschen des Agarose-Gels aufgetragen wurden, wurde in jedes Cup 5 µl Blaumarker hinzugegeben. Für den GHR-3-ARMS-Ansatz wurden 12,5 µl des 1. PCR-Ansatzes und 12,5 µl des 2. PCR-Ansatzes vermischt, mit 5 µl Blaumarker versetzt und ebenfalls auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Bei jedem Lauf lief ein Basenpaarmarker (123 bp-Marker, Gibco BRL) zur Abschätzung der Größe des PCR-Produktes mit. Bei abweichender Länge wurde der Ansatz verworfen und wiederholt.

3.3 Gel-Elektrophorese

3.3.1 Allgemeines zur Gel-Elektrophorese

Die Suche nach Sequenzvarianten in Kandidatengenomen erfordert Methoden, die einen hohen Probendurchsatz, eine hohe Detektionsrate und eine einfache, wenig arbeitsintensive Handhabung gewährleisten. Diese Anforderungen werden von den meisten Methoden auf PCR-Basis erfüllt (Cotton et al. 1991).

PCR-Produkte werden zu analytischen Zwecken durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Hierbei wird das unterschiedliche Wanderungsverhalten von den anionisch geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld ausgenutzt. Nach Anlegen einer Gleichspannung (100-200 V) wandern die DNA-Fragmente in Richtung Anode. Mit steigender Agarosekonzentration verringert sich der Porendurchmesser des Agarose-Gels und führt zu einer besseren Auftrennung kleinerer Makromoleküle. Die Agarosekonzentration der

Gele sollte sich deshalb nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente richten. Für die Auftrennung von 1000 bis 15000 bp großen DNA-Fragmenten eignet sich eine Agarose-Konzentration von 0,5 % (Knippers, 1997). Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Größe der DNA-Fragmente ab, je größer die Amplifikate, desto langsamer wandern sie durch die Gelmatrix. Eine Diffusion der DNA-Moleküle wird durch die Gelmatrix verhindert. Es bilden sich Banden aus, die sich mit Ethidiumbromid anfärben lassen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA (Newton, 1997).

3.3.2 Spezielle Durchführung der Gel-Elektrophorese

Um ein 2,5%iges Agarose-Gel zu erhalten, wurde 6,25 g Agarose in 250 ml 1 x TAE-Puffer (siehe Tabelle 2.4) aufgelöst und in einem Mikrowellengerät (Panasonic) bis zum Kochen erhitzt. Damit die Agarose sich vollständig auflöste, musste sie mindestens drei Mal aufgekocht werden. In die klare Lösung gab man 20 µl Ethidiumbromid hinzu und durchmischte es gut. Die handwarme Lösung wurde in eine abgedichtete, mit Kämmen bestückte Gelkammer gegossen.

Die Polymerisation der Gele dauerte ca. drei Stunden. Danach wurden Kämmen und Begrenzungen entfernt und das Gel in die entsprechende Elektrophoresekammer gelegt (Maxi Gel System, Owl-Scientific). Anschließend wurde das Gel mit 1 x TAE-Laufpuffer (siehe Tabelle 2.4) überschichtet. Je 15 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl Gelladungspuffer (siehe Tabelle 2.4) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Der Gelladungspuffer hielt die PCR-Produkte in den Geltaschen und diente des weiteren zur Abschätzung der Laufweite der verschiedenen PCR-Produkte. In eine flankierende Geltasche wurden 2 µl eines Größenmarkers (DNA-Längenstandard, hier 123 bp-Marker, Gibco BRL) aufgetragen, um die Fragmentlänge des PCR-Produktes abschätzen zu können. Bei 200 V Spannung trennte sich die DNA innerhalb einer halben Stunde. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zeigt sich die DNA unter UV-Licht (Mighty Bright, UV-TM-25, Hoefer Scientific Instruments) als rot-orange fluoreszierende Bande.

Statt Ethidiumbromid in die flüssige Agaroselösung zu geben, besteht die Möglichkeit das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese in Ethidiumbromid zu färben. Das Gel wurde unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera photographiert (Digitales Video-system, Polaroid).

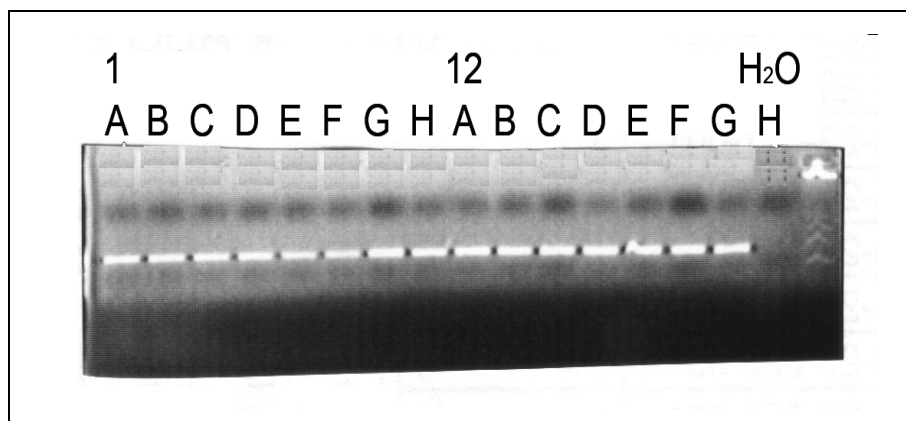


Abb. 3.1: PCR-Produkte auf Gelelektrophorese-Gel, Wasserprobe, 123 Basenpaarmarker

3.4 Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP)

3.4.1 Allgemeines zur SSCP

Die SSCP oder auch Einzelstrang-Konformationsanalyse ist eine Technik, die zur Mutationssuche verwendet wird. Sie wurde als erstes von Orita et al. (1989) beschrieben.

Bei der SSCP wird die DNA als Einzelstrang untersucht. Dabei wird die Eigenschaft der DNA genutzt, als Einzelstrang eine bestimmte dreidimensionale (Tertiär-) Struktur einzunehmen, welche auf die Primärstruktur beruht und somit spezifisch für die entsprechende Basenabfolge ist (Hayashi, 1991). Schon bei Veränderung einer einzigen Base ist in den meisten Fällen eine andere Tertiärstruktur zu beobachten. Je nach Tertiärstruktur wandern die Einzelstränge unterschiedlich schnell entlang des Spannungsgradienten durch das Polyacrylamid-Gel. Alle DNA-Proben mit der gleichen Basensequenz legen in bestimmter Zeit die gleiche Wegstrecke durch das Gel zurück. Die Tertiärstruktur wird neben der Primärstruktur auch durch physikalische Bedingungen wie pH, Temperatur und Gel-Konzentration verändert. Entscheidend bei der Detektion verschiedener Einzelstrang-Banden sind die gewählten Laufbedingungen und die Größe des PCR-Fragments (Sheffield et al., 1993). Weiter gibt es bestimmte Parameter, die entscheidend die Bandenschärfe beeinflussen, dazu gehören die Gelmatrix (Prozent Acrylamidmonomer und Vernetzungsgrad), Additiva (Glycerin, Polyethylenglykol), Puffersystem, angelegte Spannung und Dauer des Laufes (Glavac et Dean, 1993).

Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wird die DNA durch Silberfärbung detektiert. Abschließend transferiert man das Gel auf ein Blatt Papier und trocknet es in einem Vakuum-Geltrockner bei 30°C.

Sind die Bedingungen optimiert, werden die PCR-Proben des Fragmentes mit den aberranten Banden sequenziert. Die SSCP weist nur auf Konformationsänderungen hin, gibt aber keine Auskunft über die Art und Lokalisation der Mutation im DNA-Einzelstrang. Um die Basenänderungen zu spezifizieren, folgte als weiterer Arbeitsschritt die Sequenzierung des Amplifikats.

Die Sensitivität der SSCP liegt bei 70-90 % (Riesner et al., 1991; Sheffield et al., 1993).

3.4.2 Spezielle Durchführung der SSCP für *Ghrelin* Exon 1-4

Parameter, wie Gelmatrix und anzulegende Spannung wurden experimentell bestimmt. Die 10%ige Gelmatrix wurde aus den gebrauchsfertigen Lösungen Acrylamid (40%ige Lösung; Pharmacia) und Bis (2%ige Lösung; Pharmacia) hergestellt. Von einer Additiva Zugabe konnte abgesehen werden (siehe Tabelle 3.4). Der Lauf bei -20°C erbrachte keine neuen Banden und benötigte mehr Zeit. Standardisiert wurden die Läufe in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Hoefer SE 600; Hoefer Scientific Instruments) bei Raumtemperatur mit 0,5 x TBE als Laufpuffer (siehe Tabelle 2.4) und einer Fragmentgröße unter 200 bp durchgeführt. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens zwei Stunden polymerisiert haben. Der Proben-Mix bestand aus 5 µl PCR-Produkt, 5 µl *aqua bidest* und 8 µl Blaumarker. Nach fünf minütiger Denaturierung bei 95°C wurde der Mix sofort auf Eis gestellt und 8 µl hiervon in die SSCP-Geltaschen aufgetragen. Nach dem Lauf wurde die DNA mittels Silberfärbung (siehe weiter unten im Text) detektiert. Das Gel wurde abschließend auf ein Blatt Papier transferiert und in einem Vakuum-Geltrockner bei 30°C getrocknet (Uniequip, Uni Geldryer 4050).

Reagenzien	Menge
Acryl 40 %	2,5 ml
Bis 2 %	1,0 ml
10xTBE	0,5 ml
Bidest HPCL	zu 10 ml auffüllen
APS 10 %	94,0 µl
TEMED	6,0 µl

Tab. 3.4: Rezept für 10%iges SSCP-Gel

3.4.3 Silberfärbung (modifiziert nach Budowle et al., 1991)

Das Gel wurde für 5 min in *aqua bidest.* gewaschen, danach in Fixierer für 10 min fixiert und 4 min in 1%iger Salpetersäure oxidiert. Nach kurzem Abschwenken in *aqua bidest.*, wurde das Gel 30 min in einer 12 mM Silbernitrat-Lösung gefärbt und wiederholt kurz in *aqua bidest.* gewaschen. Die Reduktion des Silbers erfolgte mit Entwickler-Lösung (NaCO_3), welche umgehend nach einem bräunlichen Farbumschlag ausgewechselt wurde. Nach Erkennung diskreter Banden wurde die Entwicklung mit 10%iger Essigsäure gestoppt und das Gel für 5 min in 3%iger Glycerin-Lösung äquilibriert. Die Glycerin-Lösung soll verhindern, dass das Gel beim anschließenden Trocknen reißt.

3.5 Sequenzierung

3.5.1 Prinzip der Sequenzierung

Die Kettenabbruch- oder Sanger-Methode (Sanger et al., 1977) nutzt die Funktion der DNA-Polymerasen in vitro eine komplementäre Kopie eines gewünschten DNA-Abschnitts zu synthetisieren. Wie in 3.2.1. beschrieben, erfolgt die Synthese durch ein Oligonukleotid, das mit der freien 3'-Hydroxylgruppe sich an die komplementäre Sequenz des vorliegenden DNA-Einzelstranges anlagert. Die Kettenverlängerung erfolgt über eine Phosphordiesterbindung zwischen der Hydroxylgruppe des 3'-Kohlenstoffatoms und dem 5'-Kohlenstoffatoms des zuvor eingebauten Nukleotids. Für die Didesoxy-Sequenzierung werden vier basenspezifischen Sequenzierungsansätzen angesetzt (Didesoxynucleotid Triphosphate: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), denen ein Reaktionsmix aus 2'-Desoxy-Nukleotiden und aus den vier geringer konzentrierten ddNTPs zugesetzt wird. Durch die fehlende Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom der ddNTPs kann keine weitere Amplifikation erfolgen und es resultiert ein der statistischen Verteilung entsprechend

zufälliger Kettenabbruch. Somit entsteht aus den basenspezifischen Reaktionen eine Population von Oligonukleotidsträngen mit identischen 5'-Enden (durch den Primer festgelegt), deren 3'-Ende (festgelegt durch das jeweilige ddNTP) jedoch bezüglich der Länge variiert. Zur Detektion können Primer am 5'-Ende oder die vier ddNTPs mit Radioaktivität (^{33}P oder ^{35}S), Biotin, Digoxigenin oder Fluorophoren markiert werden. Die neu synthetisierten Amplifikate werden in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel getrennt. Bei Erreichen eines bestimmten Punktes im unteren Gelbereich werden sie über einen Laser angeregt und emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Diese Signale werden von einem Detektor gemessen, aufgezeichnet und computergestützt ausgewertet.

Die Ketten-Abbruch-Methode gehört zu den sichersten, aber auch zu den zeitaufwendigsten Methoden der Mutationsdetektion.

3.5.2 Durchführung der Automatischen Sequenzierung am LiCor 4200

Die zu sequenzierende DNA-Sequenz (welche durch ein aberrantes SSCP-Muster auffiel) wurde in dieser Studie mit fluoreszendierenden Primern amplifiziert. D. h. in einer PCR-Reaktion wurden die 5' Enden der Forward- und Reverse-Primer mit speziellen M13-Sequenzen versehen. Die F-Primers wurden mit IRD 700 und die R-Primers mit IRD 800 (MWG-Biotech) gelabelt, d. h. die Fluoreszenzsignale der Forward-Sequenzen werden bei einer Wellenlänge von 700 nm, die der Reverse-Sequenzen bei 800 nm gemessen. Vor der Sequenzreaktion erfolgte eine Aufreinigung der Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Protokoll des Herstellers (QIAGEN). Durch Vergleich der Intensität der fluoreszierenden Banden mit der entsprechenden Bande des DNA-Längenstandards (Gibco BRL) wurde nach der Aufreinigung die Konzentration der DNA-Fragmente visuell ermittelt (nach Herstellerangaben; Gibco BRL). Hierfür wurden je 4 µl aufgereinigte DNA-Amplifikate mit 4 µl Ladungspuffer auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese getrennt. Es wurde das 'Thermosequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit mit 7-deaza-dGTP' (Amersham) für das 'cycle sequencing' entsprechend der Protokolle des Herstellers verwendet. Für jedes DNA-Fragment wurden zwei getrennte Reaktionsgemische (für den Forward- und Reverse-Primer) angesetzt (siehe Tabelle 3.5).

Reagenzien	Menge
PCR-Produkt	75,0 ng
Primer (forward oder reverse)	1,0 pmol
DMSO	0,7 µl
Aqua ad infectabile ad	12,0 µl
dNTP mit einem ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP)	1,0 µl

Tab. 3.5: Reaktionsmix für Sequenzierung

Das 'cycle sequencing' beinhaltet folgende Schritte: Initiale Denaturierung 3 min 95°C, 25 Zyklen mit 30 sec 95°C, 30 sec entsprechender Annealing-Temperatur des Primers, 30 sec 70°C sowie die Elongation 3 min 72°C. Durch Zugabe von 2,5 µl Formamid loading dye wurde die Sequenzierung nach Ablauf der Zyklen gestoppt. Um die entstandenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde ein 6%iges Long-Ranger-Sequenzgel (siehe Tabelle 3.6) verwendet. Nachdem die Polymerisation des Gels durch Zugabe von 260 µl APS (10 %) und 37,5 µl TEMED gestartet wurde, konnte das Gel in eine Form (41 cm Kantenlänge und 0,25 mm Plattenabstand) gegossen werden. Nach einer Auspolymerisationszeit von mindestens zwei Stunden wurde das Gel mit den Proben beladen.

Reagenzien	Menge
Long Ranger 50 %	4,50 ml
Harnstoff	3,75 ml
10xTBE	15,75 mg
Aqua ad injectabile ad	37,50 mg

Tab. 3.6: Rezept für 6%iges Long-Ranger-Sequenzgel

Der Sequenzdetektion wurde zunächst ein Vorlauf mit 1 x TBE-Laufpuffer (siehe Tabelle 2.4) für etwa 30 min vorangestellt. Die Geltaschen wurden im Anschluss mit jeweils 7 µl der DNA-Fragment Proben beladen und bei einer Spannung von 1500 V aufgetrennt. Die von dem Sequenziergerät (LiCor 4200-2, MWG Biotech) erhaltenen Daten wurden mit entsprechender Software (Base ImagIR 4.0 von LiCor und Image Analysis von LiCor) gespeichert, analysiert und bearbeitet.

3.6 PCR-Restriktionslängen-Polymorphismus (PCR-RFLP)

3.6.1 Allgemeines zur PCR-RFLP

Der PCR-RFLP eignet sich zum Nachweis von Punktmutationen, die eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme erzeugen oder zerstören. Restriktionsenzyme wurden Ende der 60iger Jahre entdeckt (Übersicht Kessler et al., 1985). Sie erkennen eine 4 bis 6 bp lange Sequenz, die meist palindromisch zusammengesetzt ist (Melmer, 1991). An diesen Stellen schneiden die Restriktionsenzyme die doppelsträngige DNA, indem sie an die für sie spezifischen Schnittstellen die Phosphordiesterbindung hydrolysieren. Als Folge von mutativen Veränderungen im Genom können Schnittstellen verloren gehen und neue entstehen. Durch Restriktionsspaltung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte können zwei Allele über unterschiedlich lange PCR-Fragmente bestimmt werden.

3.6.2 Spezielle Durchführung der PCR-RFLP

Mit dem frei zugänglichen Online-Programm 'WebCutter' (Göteborg University, Schweden: www.medkem.gu.se/cutter/webcutter) wurde ermittelt, ob für die zu untersuchenden Sequenzabschnitte eine PCR-RFLP zur Mutationsverifizierung anwendbar ist. Die bereits gewählten Oligonukleotidprimer konnten weiterhin benutzt werden, da sich die Produkte nach der Restriktionsspaltung in ihrer Größe auf dem Agarose-Gel gut von einander unterscheiden ließen. Durch den Basenaustausch 152 G>A und den Austausch 214 C>A entstanden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *SacI* bzw. *BseNI*.

Im zweiten Exon, 152 G>A, spaltete das Restriktionsenzym *SacI* den Wildtyp (G-Allel) in zwei Fragmente zu 95 bp und 105 bp; bei Vorhandensein des A-Allels behielt das Fragment die ungeschnittene Länge von 200 bp. Das Restriktionsenzym *BseNI* detektiert das Wildtyp-Allel C (214 C>A) an Position 214, indem nach vollständigem Verdau zwei Fragmente mit 157 bp und ein Fragment mit 43 bp entstanden. Das PCR-Produkt, welches die Sequenzvariante (A-Allel) aufzeigte, blieb mit 200 bp ungeschnitten.

In der folgenden Tabelle 3.7 wird das RFLP-Rezept für beide Polymorphismen in Exon 2 (Arg-51-Gln und Leu-72-Met) dargestellt.

Arg-51-Gln		Leu-72-Met	
PCR-Produkt	15,0 µl	PCR-Produkt	15,0 µl
H ₂ O	11,8 µl	H ₂ O	11,9 µl
Puffer (+/Tango)	3,0 µl	Puffer (B+)	3,0 µl
Enzym (<i>SacI</i>)	0,2 µl	Enzym (<i>BseNI</i>)	0,1 µl

Tab. 3.7: RFLP-Rezept für Ghrelin-Exon2 (Arg-51-Gln, Leu-72-Met). H₂O, Puffer, Enzym und PCR-Produkt stellen den Verdaumix dar.

15,0 µl Verdaumix pro Cup wurden über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert (Wipp-Schüttler Duomax 1030, Heidolph). Am nächsten Morgen erfolgte die Größenauftrennung der Produkte in einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese.

3.7 Allelspezifische Amplifikation (ARMS-Test)

3.7.1 Allgemeines zu ARMS

Mit der ARMS-PCR ist eine alternative Methode zur RFLP-PCR gegeben. Punktmutationen, die nicht über RFLP nachgewiesen werden können, lassen sich über die ARMS-PCR alternativ bestätigen (Newton et al., 1989). Es ist eine einfache und kostengünstige Methode, um SNPs schnell und mit hohem Durchsatz zu analysieren. Die ARMS-Methode basiert darauf, dass Primer sequenzspezifisch sind und nur zur Amplifikation führen, wenn sie an die DNA-Zielsequenz anlagern können.

Die Primer stellen den kritischen Part der Methode dar und müssen sorgsam ausgewählt werden. Sie sollten mindestens 28 Nukleotide lang sein. Der mutationsspezifische Primer ist passend zu dem mutierten Allel des SNPs, d. h. am 3'-Ende wird die letzte Base des inneren Oligonukleotids entsprechend komplementär zu dem Allel der Sequenzvariante eingebaut. Um zu verhindern, dass es trotz terminaler Fehlpaarung mit der Wildtyp-DNA zur Amplifikation kommt, wird an der zweiten Position, der vorletzten Base, des 3'terminalen Endes des inneren Primers nach der Tabelle 3.6 verändert (Kwok et al., 1990).

Terminale Fehlpaarung	Nukleotid des kodierenden Stranges korrespondierend zu dem vorletzten Nukleotid in dem inneren Primer			
am 3'-Ende	A	G	C	T
AA	A	G	A	G
AG	C	T	A	G
AC	G	A	C	T
TT	C	T	A	G
TG	G	A	T	C oder T
TC	C	T	A	G
CC	C	T	A	G
GG	A	G	A	G

Tab. 3.8: Design der ARMS-Primer zum Ausschluss von Fehlamplifikationen

¹⁾ Die rechte Spalte listet die terminalen Fehlpaarungen am 3'-Ende auf, z. B. eine Mutation in dem kodierenden Strang mit der normalen Base im nicht kodierenden Strang.)

Die äußeren Primer werden in unterschiedlichen Abständen zum SNP positioniert. Ye et al. (2001) entwickelten zur Erstellung von ARMS-Primern ein Computerprogramm (http://cedar.genetics.saton.ac.uk/public_html/primer1.html). Mittels dieser Oligonukleotide entstehen unterschiedlich lange, allelspezifische Amplifikate. Die Auswertung erfolgt über Gel-Elektrophorese.

3.7.2 Spezielle Durchführung der ARMS-PCR

Zur Verifizierung des neu entdeckten Polymorphismus Gln-90-Leu wurde eine ARMS-PCR durchgeführt (Rezept des PCR-Ansatzes siehe Tabelle 3.2., Thermocycler-Bedingungen siehe Tabelle 3.3.).

Das Wildtyp-Fragment, das spezifisch dem A-Allel gebildet wurde, war 244 bp lang und somit das längste Fragment. Das mutationsspezifische Fragment (T-Allel) war mit 221 bp kürzer. Probanden mit heterozygotem Muster wiesen im Agarose-Gel zwei Fragmente/Banden auf, ein Fragment mit 221 bp (T-Allel) und ein Fragment mit 244 bp (A-Allel) (siehe Abbildung 3.2).

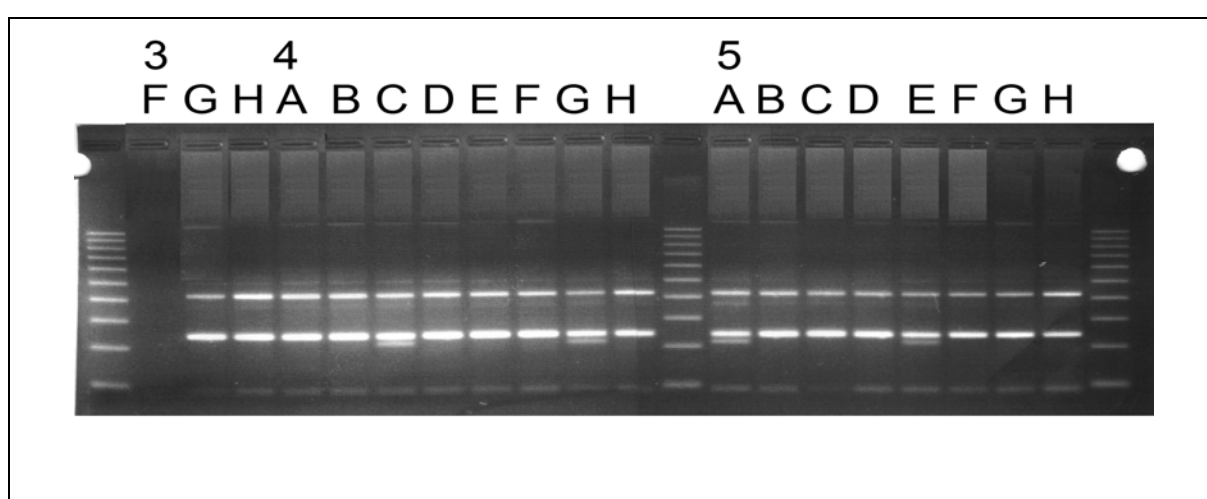


Abb. 3.2 ARMS-PCR-Ergebnis: Die unteren beiden Banden entsprechen dem 221 bp (T-Allel) und 244 bp (A-Allel) langem Fragment des Gln-90-Leu-Polymorphismus.

3.8 Statistische Verfahren

3.8.1 Assoziationsstudie

3.8.1.1 Kopplung

Von Kopplung spricht man, wenn zwei genetische Marker überzufällig häufig gemeinsam vererbt werden. Sie werden um so häufiger gemeinsam vererbt, je enger sie auf demselben Chromosom nebeneinander liegen. Sind die Loci weit von einander entfernt, führen Rekombinationsereignisse häufiger zu neuen Allelkombinationen (Bödder und Ziegler, 2000). Von einem Kopplungsungleichgewicht, *'linkage disequilibrium'*, wird gesprochen, wenn verschiedene Genloci häufiger als es nach einer unabhängigen Vererbung beider Loci zu erwarten wäre, gemeinsam vererbt werden (Lander und Schork, 1994). Die Quantifizierung dieses Ungleichgewichts gilt als Parameter der Entfernung beider Loci voneinander.

Ein Kopplungsbefund zweier Genloci ist nicht gleichzusetzen mit einer Assoziation (Allel-Verknüpfung) zu einem Phänotyp. Liegt ein genetischer Marker mit einer den Phänotyp verursachenden DNA-Sequenz im Kopplungsungleichgewicht, wird der Marker gemeinsam mit der merkmalsverursachenden DNA-Abschnitt vererbt. Folglich kann man dadurch Bereiche im Genom eingrenzen, in denen eine assoziierte Mutation für den zu untersuchenden Phänotyp wahrscheinlich ist (Lander und Schork, 1994).

In Kopplungsstudien wird nach konkordanten Erbgängen gesucht. Assoziationsstudien fokussieren die Allelfrequenz innerhalb einer Population.

3.8.1.2 Assoziation

Unter Assoziation versteht man die gemeinsame Vererbung von spezifischen Allelen eines genetischen Markers, die zusammen mit einem bestimmten Phänotyp auftreten. Auf Bevölkerungsebene kann eine Assoziation zwischen einem Phänotyp und einem bestimmten Allel verschiedene Gründe haben (Lander und Schork, 1994; Strachan und Read, 1999): 1.) Das Allel verursacht den Phänotyp. 2.) Das Allel A liegt mit einem zweiten Phänotyp relevanten Allel B im Kopplungsungleichgewicht. Das gilt nur unter der Voraussetzung, dass Allel A und B sehr eng nebeneinander auf einem "Urchromosom" der Population liegen. Die Allele A und B wären zeitlich nebeneinander entstanden. Allel A hat in diesem Fall nur einen Indikatorcharakter für den Phänotyp (s. Kopplung).

So genannte Schichtungseffekte können zu Scheinassoziation führen, wenn bei gegebenem Phänotyp Allelfrequenzen verschiedener ethnischer Gruppen miteinander verglichen werden. Vergleicht man eine Population, in der sowohl der zu untersuchende Phänotyp als auch das Allel A häufig auftreten mit einer Kontrollgruppe aus einer anderen Population, in der z. B. weder das Allel A noch der Phänotyp häufig auftreten, so kann eine falsche Assoziation resultieren.

Um diese Schichtungseffekte zu umgehen, ist es unbedingt erforderlich die Assoziationsstudie in einer möglichst homogenen Population durchzuführen. Die Kontrollen sollten bis auf das zu untersuchende Merkmal in allen Eigenschaften mit der Fallgruppe gleich sein (Lander et Schork, 1994). In familienbasierten Assoziationsstudien werden Kinder mit deren Eltern (so genannte Trios) untersucht. Dabei gelten die nicht transmittierten elterlichen Allele als „interne“ Kontrollen (Böddiker und Ziegler, 2000). Interne Kontrollen werden beispielsweise bei zwei Methoden - dem Haplotype Relative Risk Test (HRR) und dem Transmission Disequilibrium-Test (TDT; Strachan und Read, 1999) - verwendet.

3.8.1.3 Durchführung einer Assoziationsstudie

Allel-basierende Methoden haben den Vorteil, dass ihnen keine Modellannahme des Erbganges vorausgehen. Infolgedessen können in der statistischen Berechnung nicht-parametrische Tests, wie etwa der Chi-Quadrat Test angewandt werden. In den nicht-

parametrischen Tests werden zwei unabhängig relative Häufigkeiten miteinander verglichen. Die Durchführung eines statistischen Tests umfasste die folgenden Schritte:

1. **Formulierung der Hypothese und Formulierung der Verteilungsannahmen:** Es werden eine Nullhypothese ($H_0: p_1 = p_2$) und eine zweiseitige Gegenhypothese ($H_1: p_1 \neq p_2$) aufgestellt. Die Häufigkeiten p_1 und p_2 stehen für die jeweiligen Anteile einer bestimmten Phänotypausprägung an der Grundgesamtheit, z. B. der adipösen Probanden (p_1) und der nicht-adipösen Kontrollgruppe (p_2). Die Nullhypothese nimmt an, dass der Phänotyp unabhängig von der Verteilung der Allele ist. Die Gegenhypothese nimmt an, dass der Phänotyp von der Verteilung der Allele abhängig ist, also eine Assoziation vorliegt. Eine explorative Untersuchung liegt vor, wenn kein Vorwissen bezüglich der Allelverteilung, des genetischen Modells, usw. vorliegen. Die Gegenhypothese wird zweiseitig formuliert, wenn kein Wissen über die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer $\hat{p}_{1,2}$ besteht ($\hat{p}_1 < \hat{p}_2$ oder $\hat{p}_1 > \hat{p}_2$). Nach einer initialen Assoziationsstudie kann zur Bestätigung der Assoziation in einer anderen Population eine einseitig Gegenhypothese formuliert werden.
2. **Wahl der Stichproben:** Es wird entschieden, welche Stichproben der verschiedenen Phänotypen zum Einsatz kommen.
3. **Wahl der Teststatistik:** Die Teststatistiken werden mittels χ^2 -Test durchgeführt (siehe Tabelle 3.7). Diese Vierfeldertafel hat einen Freiheitsgrad; d. h. bei gegebenen Randsummen kann nur ein Feld frei gewählt werden.
4. **Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit α (Signifikanzniveau) und kritischer χ^2 -Wert:** Das Signifikanzniveau begrenzt den Fehler erster Art, d. h. es wird die Nullhypothese H_0 abgelehnt, obwohl sie richtig ist. Das Signifikanzniveau wurde immer mit $\alpha = 0,05$ vorgegeben. Die kritische Grenze des zweiseitigen χ^2 -Wertes mit einem Freiheitsgrad und dieser Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 3,84. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit für die Nullhypothese an und wird mit einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen (Sachs; 1974).
5. **Durchführung der Teststatistiken und Interpretation der Ergebnisse:** Der errechnete χ^2 -Wert und p-Wert indiziert, ob der Unterschied zwischen den zwei beobachteten relativen Häufigkeiten mit der Nullhypothese verträglich ist oder nicht. Werte von $\chi^2 >$

3,84 oder p-Werte $< 0,05$ sprechen bei diesem Signifikanzniveau gegen die Nullhypothese und führen zu ihrer Verwerfung.

3.8.2 Teststatistiken

3.8.2.1 χ^2 -Test

Geprüft werden die Hypothesen:

H_0 = Die Verteilung der Allele ist **unabhängig** von dem Phänotyp.

H_1 = Die Verteilung der Allele ist **abhängig** vom Phänotyp (**Assoziation**).

In eine Vierfeldertafel (siehe Tabelle 3.9) werden die festgestellten Häufigkeiten der Allele für die Stichproben eingetragen. Der χ^2 -Wert wird über den entsprechenden χ^2 -Test mit dem Statistikprogramm 'StatXact for Windows' (Cytel Software Corp.) berechnet.

Merkmal 1 (Allel)	Allel A ₁	Allel A ₂	Zeilensummen	Erwartungshäufigkeiten
Merkmal 2 (Gewicht)				
Fälle	a	b	$a + b = n_1$	$\frac{a}{n_1} = \hat{p}_1$
Kontrollen	c	d	$c + d = n_2$	$\frac{c}{n_2} = \hat{p}_2$
Spaltensummen	$a + c$	$b + d$	$n_1 + n_2 = n$	

Tab. 3.9: Schema einer Vierfeldertafel beim χ^2 -Test

3.8.2.2 χ^2 -Test nach Pearson

Der Erwartungswert des χ^2 -Testes bestimmt welche Variante des Testes (asymptotisch nach Pearson oder exakt nach Fisher) genommen wird. Voraussetzung ist allerdings, dass alle drei Genotypen (homozygot Wildtyp, homozygot Mutation, heterozygot) auftreten (2 x 3 Tafel). Da bei den untersuchten Markern keine homozygoten Mutationsträger beobachtet wurden, sind die zugehörigen, beobachteten Genotypen in der 2 x 2 Tafel über den Pearson's χ^2 -Test analysiert worden.

χ^2 Test nach Pearson:	$\chi^2 = \frac{n (ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$
-----------------------------	---

3.8.2.3 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium beschreibt die Genotyphäufigkeiten aus den Anteilen der verschiedenen Allele eines Gens in einer Population. Diese Gleichung setzt eine ausreichend große Population und Panmixie voraus (Strachan und Read, 1999). Mit der Formel lassen sich nach experimentell ermittelten Allelfrequenzen die Häufigkeiten der drei Genotypen (homozygot für Allel 1, homozygot für Allel 2, heterozygot für Allel 1 und Allel 2) in einer Population berechnen. Die berechneten Genotypfrequenzen sollten mit den experimentell gefundenen übereinstimmen (Strachan und Read, 1999).

Hardy-Weinberg-Äquilibrium:	$1 = p^2 + 2pq + q^2$
-----------------------------	-----------------------

p: Allelhäufigkeit von Allel A₁ und q: Allelhäufigkeit von Allel A₂

Ein p- bzw. q-Wert unter <0,05 weist auf ein Disäquilibrium hin. Folgende Ursachen können eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bewirken: Auslese durch nicht zufällige Paarung, Inzucht, Spontanmutationen, Selektion, genetischer Drift, Gründereffekt, Migration und Fehler in der Ermittlung der Genotypen (Strachan und Read, 1999).

4 Ergebnisse

Um Aussagen über eine mögliche Beteiligung von Ghrelin an der menschlichen Gewichtsentwicklung zu treffen, wurden die kodierenden Regionen auf Sequenzvarianten durchsucht. Ziel war es:

- Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Ghrelin*-Gens zu ermitteln. (vgl. 4.1)
- Polymorphismen als Marker für Assoziationsstudien einzusetzen (vgl. 4.2).

4.1 Ermittlung von Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Ghrelin*-Gens

Das *Pre-Pro-Ghrelin* umfasst 4,3 kp. Die kodierende Region besteht aus vier unterschiedlich großen Exons (20 bp bis 117 bp) (Wajnrach et al., 2000). Für diese Exongrößen bot sich als Mutationsdetektionsmethode die SSCP an, welche eine hohe Sensitivität für Fragmente bis 250 bp aufweist. Das *Pre-Pro-Ghrelin*, das die Vorstufe vom biologisch aktivem Peptid ist, besteht aus 117AS: Davon bilden die ersten 23 AS eine Signalsequenz und die terminalen AS 52-117 den ‚Schwanz‘ (Wajnrach et al., 2000); das biologisch aktive *Ghrelin* umfasst die AS 24-51 und ist somit 28 AS lang (siehe Abbildung 1.2 und 4.2).

In der Datenbank waren bis zur Veröffentlichung unserer Ergebnisse zwei SNPs: 152 G>A und 214 C>A bekannt. 152 G>A verursacht einen AS-Wechsel von Arginin an Position 51 zu Glutamin; 214 C>A einen AS-Wechsel von Leucin an Position 72 zu Methionin. Ukkola et al. (2001) und Korbonits et al. (2002) belegten in ihren Studien für den SNP 214 C>A (Leu-72-Met) eine Assoziation zum Phänotyp Adipositas (siehe 5.1.3). Des Weiteren konnten Ukkola et al. (2001) und Steinle et al. (2005) eine Assoziation für den SNP 152 G>A belegen.

Zuerst wurden Primerpaare flankierend zu den kodierenden Regionen erstellt. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen (siehe 3.2.2.) konnten die Produkte mittels Agarose-Gel-elektrophorese untersuchen werden (siehe 3.3.2). Anschließend wurde eine SSCP durchgeführt (siehe 3.4.2). Die PCR-Produkte der Probanden, die über aberrante Banden auffielen, wurden sequenziert. Insgesamt wurden fünf Sequenzvarianten detektiert (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1).

```

1  agtccccctct aaacacgggg gatgtcggac tgtctggctg gaagacagag cttcatttag
61  gagctacctc taacccctc cctgctgagt gccctggggc ccttgtctgt tcagcttcct
121 cctcctcat gaaaagactc gccatgagct ctcagagcct gggacaaaag gcaccgggga
181 ggacccccag cccctatcaa gtctgtctgc caggtgttct gccctgaacg gccttgga
241 agagaacaca catccatcat cttctacctt gggaggtgga agcgggggtc ctctctacac
301 agcagtcagg accccagatg gtaaagccct tcacgccatc tgctgggctc ctacctgagc
361 aagctcagag gcacatgaga aggggaggca gctgcctgga gaccctctct ccccaggcc
421 cacctgtctg caaccagct gaggccatgc cctccccagg gaccgtctgc agcctcctgc
481 tcctcggcat gctctggctg gacttggcca tggcaggctc cagcttctct agcctgaac
541 accagagagt ccaggtgaga cctccccaca aagccccaca tgttggtcca gcctgccac
601 tttagcaacca gctctgtgac ctggagcagc agcgcctatc ctgggcttca gtcttctccc
661 agagcaca aa ggactctggg tctgacctca ctgtttctgg aaggacatgg gggttagag
721 tcctaaacag actgtttcc ccttcagca gagaaaggag tcgaagaagc caccagccaa
781 gctgcagccc cgagctcttag caggctggct ccgcccgaa gatggaggtc aagcagaagg
841 ggcagaggat gaaatgggag tccgggtcgg tacctctgca gttttatgct tctgtggcag
901 cgaggagggt ggggtcaggg gagaggagg gcaggagag gtggcagtga acagggtccc
[961.....3720] (weitere Basenpaare im Intron)
3721 cctgaagaga ggcagagagc ccagagcccc ctttgagatg gggatgggca tgacctctga
3781 catctcctgg gtccctcctg ccctgcctcc tagttcaacg cccctttga tgttggaatc
3841 aagctgtcag gggttcagta ccagcagcac agccaggccc tggggaagt tcttcaggac
3901 atcctctggg aagaggccaa aggtgagtc tgccctggact gggtttgctc ggtttccttg
3961 cagccccaca tgggagtcca ctctgtgggt gatgagttt cccaacctc tgctctcca
4621 gctccccac aacccccacc attacatccc acctccaatc tcaccaccgt ggaagaaaag
4681 cactagcagg acggtgcacc cagcattctt actcaacctc ttgctttcca gaggccccag
4741 ccgacaagtg atcgccccaca agccttactc acctctctc aagtttagaa gcgctcatct
4801 ggcttttcgc ttgcttctgc agcaactccc acgactgttg tacaagctca ggaggcgaat
4861 aaatgttcaa actgtatgct gatgttccaa atgggaattt atttcaaaga ggaaaagtta
4921 atattttact ttaaaaaaat caaaataata caaataaaaa taattcttgg tttatggtct
4981 gtgggaaggg aataaaagga caagtagcaa ggccaatgtg catgtttaga aaacctaatc
5041 acaccagctc actcaagcag agaagctact gcatgtgcat gcattgtgtg gaattaagac
5101 tgggtttctt agagaaggag gagagaaagg gggagagtag gagggagagg ggaaaaggag
5161 gagggagagg aagagaaaga agagataaag tgggactaa

```

Abb. 4.1: Detektierte Sequenzvarianten in der Ghrelin-Sequenz.

Doppelt unterstrichen sind die Start- und Stop-Kodons. Fett gedruckt sind die Exons, nicht fett gedruckt die Introns. Einfach unterstrichen sind die Primer. Grau unterlegt ist das biologisch aktive Ghrelin. In Klammern sind die Sequenzvarianten. Die Restriktionsenzym-Schnittstellen der RFLP-PCR sind in den Klammern mit Pfeilen gekennzeichnet. Grün ist die Deletion von AG; Türkis die Deletion im Intron; Rot der SNP Arg-51-Gln (152 G>A); Blau der SNP Leu-72-Met (214 C>A) und braun der SNP Gln-90-Leu im dritten Exon (269 A>T).

Von den fünf Varianten haben vier Einfluss auf die Proteinsequenz, zwei liegen im Bereich des biologisch aktiven Ghrelins. Die Deletion von zwei Basenpaaren in Exon 1 führt zu

einem Frameshift ab der 34. AS und somit Einbau von 36 aberranten AS und einem Stop-Kodon an Position 71. Bei der Untersuchung des zweiten Exons und den flankierenden Bereichen entdeckten wir eine 1 bp-Deletion im ersten Intron. Weiterhin wurden zwei Polymorphismen im zweiten und ein Polymorphismus im dritten Exon identifiziert. Alle drei Polymorphismen sind Missense-Varianten, die zu einem Aminosäurenaustausch führen.



Abb. 4.2: Darstellung der AS-Sequenz Ghrelins mit den detektierten Polymorphismen:

Schwarz ist die Signalsequenz, Grün ist das biologisch aktive Ghrelin, Olivgrün ist die Schwanzsequenz. Rot ist die Deletion und somit Start des Frameshifts ab der 34. AS, Weinrot ist der Polymorphismus Arg-51-Gln, Violett der Polymorphismus Leu-72-Met, Rosa der Polymorphismus Gln-90-Leu.

Exon	Variante	Basenposition in der cDNA	Wirkung auf die AS-Sequenz	adipöse Probanden (n= 215)	Normalgew. Kontrollen (n= 93)
GHR-1	Deletion (AG)	102+103	Frameshift ab 34. AS mit Einbau von 36 AS bis Stop-Kodon an Position 71	0	1
GHR-2	Deletion (C)	738	Intron	1	0
	Polymorphismus SNP (G/A)	152 G > A	Arg-51-Gln	8	3
	Polymorphismus SNP (C/A)	214 C < A	Leu-72-Met	39	16
GHR-3	Polymorphismus SNP (A/T)	269 A > T	Gln-90-Leu	27	3
GHR-4	keine				

Tab. 4.1: Ergebnisse zu den gefunden Sequenzvarianten von Ghrelin.

Zur Verifizierung der zwei gefunden Polymorphismen in Exon 2 wurde eine RFLP-PCR etabliert (siehe 3.6.2). Die genauen Bedingungen sind in Tabelle 3.7 aufgezeigt. Der Polymorphismus in Exon 3 wurde über eine ARMS-PCR bestätigt (siehe 3.7.2).

4.1.1 Seltene genetische Varianten

Die detektierten Deletionen im ersten Exon und ersten Intron entsprechen mit ihrer Allelhäufigkeit unter einem Prozent seltenen genetischen Varianten. In der Gesamtstichprobe wurde jeweils nur ein Träger mit der jeweiligen Variante gefunden.

4.1.1.1 Die Frameshift-Mutation im ersten Exon

Die 2 bp-Deletion im 34. Kodon *Ghrelins* führt zu einem Frameshift. Durch die Deletion von zwei Basenpaaren werden ab der 34. AS 36 abweichende AS eingebaut. An Position 71 befindet sich bei dieser Sequenzvariante ein Stop-Kodon. Da die Frameshift-Mutation die kodierende Region des biologisch aktiven Ghrelins betrifft, geht man hier von einer funktionsrelevanten Mutation aus. Diese Sequenzvariante fand sich nur bei einem normalgewichtigen Probanden. Daran angeschlossene Analysen konnten weder Auffälligkeiten in der Gewichtsentwicklung noch im Essverhalten des Mutationsträgers gefunden werden. Es ist höchst wahrscheinlich, dass eine Haplo-Insuffizienz vorliegt.

4.1.1.2 Die 1 bp Deletion im ersten Intron

Zur Ermittlung von Sequenzvarianten in den vier Exons *Ghrelin*s wurden stets Abschnitte von den benachbarten Introns mituntersucht. Die 1 bp-Deletion wurde bei der Untersuchung des ersten Exons im Intron entdeckt. Sie lag bei einem adipösen Probanden vor. Da die Deletion aber nur bei einem Probanden und zudem im Intron lag, ist eine Beteiligung an der Pathogenese von Adipositas eher unwahrscheinlich. Eine Mutation im Intron mit nur einem AS-Austausch hat keine Konsequenz auf das Peptid. Ein Kopplungsungleichgewicht mit einer Phänotyp relevanten Sequenzvariante ist eine noch vorstellbare Verknüpfung zu Adipositas.

4.1.2 Polymorphismen

Bei einer Allelhäufigkeit von über einem Prozent in der Normalbevölkerung spricht man von Polymorphismen bzw. SNPs. Die Allelfrequenzen der detektierten Sequenzvarianten im zweiten und dritten Exon betrugen in den Studiengruppen für 51-Gln 0,019 und 0,016, für 72-Met 0,091 und 0,086 und für 90-Leu in der erweiterten Studiengruppe 0,063, 0,063 und 0,068 (siehe Tabelle 4.3). Die Basen-Substitutionen aller drei SNPs führen zu einem AS-Austausch.

Bei Punktmutationen unterscheidet man:

- Transition (Austausch einer Pyrimidinbase durch eine Pyrimidinbase bzw. einer Purinbase durch eine Purinbase),
- Transversion (Substitution einer Pyrimidinbase durch eine Purinbase und umgekehrt).

SNP	DNA-Sequenz 5'→3'	Art der Substitution auf DNA- und Peptidebene
152 G > A	cga → caa	Transition Missensmutation (Arg-51-Gln)
214 C > A	ctg → atg	Transversion Missensmutation (Leu-72-Met)
269 A > T	cag → ctg	Transversion Missensmutation (Gln-89-Leu)

Tab. 4.2: Darstellung der Basen-Substitutionen der untersuchten SNPs im *Ghrelin*-Gen (Arg-51-Gln, Leu-72-Met, Gln-90-Leu) mit Auswirkung auf die DNA-Sequenz und Peptidebene

4.1.2.1 Der 152 G>A Polymorphismus

Der 152 G>A-Polymorphismus stellt eine Transition dar, Guanin wird durch Adenin ersetzt. Aufgrund des genetischen Codes führt dies auf der Proteinebene zu einem AS-Austausch von Arginin zu Glutamin. Man spricht hier auch von einer Missensmutation.

Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenzen. Das A-Allel an Position 152 lag nur bei sieben adipösen und drei normalgewichtigen Probanden vor (siehe Tabelle 4.1 und 4.3). Steinle et al. (2005) belegten in ihrer Studie eine Assoziation von A-Allel-Trägern und einer erhöhten Prävalenz des metabolischen Syndroms.

4.1.2.2 Der 214 C>A Polymorphismus

Bei dem Polymorphismus 214 C>A wurde Cytosin gegen Adenin ausgetauscht. Auch diese Substitution wirkt sich im Sinne einer Missensmutation auf der Proteinebene aus: Leucin wird durch Methionin ersetzt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Korbonits et al. (2002) und Ukkola et al. (2001) ergaben sich in unserem Studienkollektiv keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenzen. Das A-Allel an Position 214 lag bei 39 der 215 adipösen und 16 der 93 normalgewichtigen Probanden vor (siehe Tabelle 4.1 und 4.3).

4.1.2.3 Der 269 A>T Polymorphismus

Durch die Substitution von Adenin durch Thymin an Position 269 entstand eine weitere Missensmutation. Auf Proteinebene wurde an Position 90 Glutamin durch Leucin ersetzt.

In den initialen Studiengruppen fiel ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0012$) zwischen der 90-Leu Allelfrequenz bei adipösen (0,063) und normalgewichtigen Probanden einer Kontrollgruppe (0,016) auf. Um diesen Befund zu bestätigen, wurde die Studiengruppe mit untergewichtigen Studenten und normalgewichtigen Erwachsenen erweitert. Der signifikante Unterschied lies sich nach der Erweiterung der Studiengruppe nicht mehr nachweisen. Die T-Allelfrequenz war zwischen den einzelnen Gruppen fast identisch (siehe Tabelle 4.1 und 4.3).

4.2 Studiengruppe

Studiengruppe		Arg-51-Gln Genotyp			Leu-72-Met Genotyp			Gln-90-Leu Genotyp		
		GG	GA	AA	CC	CA	AA	AA	AT	TT
adipöse Kinder + Jugendliche (n = 215) [°]	Anzahl	208	7	0	176	39	0	188	27	0
	Prozent	(96,7)	(3,3)	(0,0)	(81,9)	(18,1)	(0,0)	(87,4)	(12,6)	(0,0)
normalgew. Studenten (n = 93) [°]	Anzahl	90	3	0	77	16	0	90	3	0
	Prozent	(96,8)	(3,2)	(0,0)	(82,8)	(17,2)	(0,0)	(96,8)	(3,2)	(0,0)
normalgew. Erwachsene (n = 44)*	Anzahl							38	6	0
	Prozent	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	(86,4)	(13,6)	(0,0)
untergew. Studenten (n = 134)*	Anzahl							117	17	0
	Prozent	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	(87,3)	(12,7)	(0,0)

Tab. 4.3: Ergebnisdarstellung der detektierten Polymorphismen (Arg-51-Gln, Leu-72-Met, Gln-90-Leu) im Ghrelin-Gen.

*Aufteilung nach Studiengruppen (adipöse Kinder und Jugendliche, normalgewichtige Studenten, normalgewichtige Erwachsene, untergewichtige Studenten) und nach Genotypen der drei Polymorphismen (Arg-51-Gln, Leu-72-Met, Gln-90-Leu). [°] bezeichnet die initiale Studiengruppe mit * ist die erweiterte Studiengruppe gekennzeichnet. Unter der Anzahl stehen in Klammern die Prozentangaben.*

4.3 Ergebnisse der Assoziationsstudie für die Polymorphismen in Exon 2 und 3

Die Beteiligung der Allele der drei detektierten Polymorphismen an der Gewichtsregulation wurde in einer Assoziationsstudie an extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie normal- und untergewichtigen Kontrollen untersucht. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, sollte sich die Kontrollgruppe im Vergleich zu der Studiengruppe möglichst nur in dem zu untersuchenden Merkmal (hier Phänotyp Adipositas) unterscheiden. Es wurde bei der Rekrutierung der Probanden besonderer Wert auf einen deutlichen Unterschied in den BMI-

Perzentilen gelegt: Der BMI der adipösen Probanden lag über der 99. BMI-Perzentile, der der untergewichtigen unter der 15. BMI-Perzentile und der der normalgewichtigen über der 30. und unter der 69. BMI-Perzentile (siehe 2.1). Insgesamt wurden 215 extrem adipöse Kinder mit 93 normalgewichtigen Studenten hinsichtlich der Genotyp- (homozygot, heterozygot) und Allelhäufigkeit verglichen. Für den Gln-90-Leu Polymorphismus wurde die Studiengruppe mit 44 normalgewichtigen Erwachsenen und 134 untergewichtigen Studenten erweitert. Unter den untersuchten Probanden konnten keine homozygoten Mutationsträger identifiziert werden. Die hier experimentell ermittelten Genotypfrequenzen stimmten alle mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium überein.

Die Prüfung erfolgte über den χ^2 -Test nach Pearson (siehe 3.8.2.2).

Folgende Hypothesen wurden überprüft:

H_0 = Die beiden Allele der Polymorphismen sind **nicht** mit dem Phänotyp Adipositas **assoziiert**

H_1 = Eines der beiden Allele ist mit dem Phänotyp Adipositas **assoziiert**.

4.3.1 Bewertung der Assoziationsstudie für den 152 G>A Polymorphismus in Exon 2

Da der 152 G>A-SNP in der Sequenz des biologisch aktiven *Ghrelin*s liegt, war es besonders interessant zu erfahren, ob bei der Sequenzvariante 152 G>A, die auch zu einem AS-Austausch führte, eine Assoziation zum Phänotyp Adipositas vorlag.

Die Hypothesen für der Assoziationsstudie zum 152 G>A Polymorphismus lautete:

H_0 = Die beiden Allele der 152 G>A Sequenzvariante sind **nicht** mit dem Phänotyp Adipositas **assoziiert**

H_1 = Eines der beiden Allele (G oder A) ist mit dem Phänotyp Adipositas **assoziiert**

Die Ergebnisse des Assoziationstests mit Darstellung der Genotypverteilung sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Die Nullhypothese musste mit dem Signifikanzniveau von 5 % angenommen werden, da der p-Wert des χ^2 -Testes nach Pearson 0,83 entsprach. Keines der beiden Allele zeigte unter diesem Studiendesign eine Assoziation zu Adipositas.

4.3.2 Bewertung der Assoziationsstudie für den 214 C>A Polymorphismus in Exon 2

Ebenso wie der 152 G>A Polymorphismus führte auch der Polymorphismus (214 C>A) zu einem AS-Austausch. Um die Bedeutung des 214 C>A SNPs zur Ausprägung des Phänotyps Adipositas zu klären, wurde eine Assoziationsstudie durchgeführt. Die Stichproben entsprachen denen der Studie für die 152 G>A Variante (initiale Studiengruppe). Der 214 C>A Polymorphismus war bei Veröffentlichung unserer Studie bereits von Ukkola et al. (2001) beschrieben worden, Korbonits et al. (2002) veröffentlichte nach unserer Publikation eine Studie zu diesem Polymorphismus. Beide konnten in ihren Studien eine positive Assoziation zum Phänotyp Adipositas aufweisen (siehe 5.1.3).

Die Ergebnisse des Assoziationstestes mit Darstellung der Genotypverteilung sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Es wurde mit dem χ^2 -Test nach Pearson gerechnet. Folgende Hypothesen wurden überprüft:

H_0 = Die beiden Allele der 214 C>A Variante sind **nicht** mit dem Phänotyp Adipositas **assoziiert**

H_1 = Eines der beiden Allele (C oder A) ist mit dem Phänotyp Adipositas **assoziiert**.

Der p-Wert des Pearson's Chi-Square-Test lag für adipöse Probanden verglichen mit normalgewichtigen Studenten bei 0,84 und war somit nicht signifikant. Auch hier konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Studien von Ukkola et al. (2001) und Korbonits et al. (2002) zeigte in unserer Studiengruppe keines der beiden Allele des Leu-72-Met Polymorphismus eine Assoziation zu Adipositas.

4.3.3 Bewertung der Assoziationsstudie für den 269 A>T Polymorphismus in Exon 3

Um die Beteiligung des neu detektierten 269 A>T SNP in Exon 3 an der Gewichtsregulation zu untersuchen, wurde auch hier eine Assoziationsstudie zum Phänotyp Adipositas durchgeführt.

Die Ergebnisse der Assoziationstests mit Darstellung der Genotypverteilung sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

In der initialen Studiengruppe zeigte sich nach dem asymptotischen χ^2 -Test nach Pearson ein signifikanter p-Wert (0,011). Die Allelfrequenz des 90-Leu Allels war signifikant höher bei den extrem adipösen Kindern und Jugendlichen als bei den normalgewichtigen Studenten

(6,83 % versus 1,61 %). Um die signifikante, positive Assoziation zu bestätigen wurde daraufhin die Stichprobe mit 134 untergewichtigen Studenten und 44 normalgewichtigen Erwachsenen erweitert. Untergewichtige wiesen ähnlich wie normalgewichtige Erwachsene und adipöse Probanden eine Allelfrequenz von ungefähr 6 % auf (6,34 %; 6,83 %; 6,28 %). Keiner der untersuchten Probanden war homozygot für das T-Allel (siehe Tabelle 4.3).

Die p-Werte lagen alle über 0,8 (Adipöse versus Untergewichtige: 0,97; Normalgewichtige versus Untergewichtige: 0,87; Normalgewichtige versus Adipöse: 0,84).

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war das *Ghrelin-Gen* als Kandidatengen für den Phänotyp Adipositas zu untersuchen. Hierfür wurde mittels SSCP nach funktionsrelevanten Mutationen sowie bekannten und unbekannten Polymorphismen in der kodierenden Region des *Ghrelin-Gens* gesucht. Die Stichprobe bestand aus adipösen Kindern und Jugendlichen sowie aus normal- und untergewichtigen Kontrollen. Die ermittelten Polymorphismen wurden als Marker in Assoziationsstudien eingesetzt.

5.1 Bewertung der detektierten Sequenzvarianten

5.1.1 Ghrelin

Nach der Erkenntnis über die sekretionsfördernde Wirkung von *Ghrelin* auf das Wachstumshormon wurde in Tiermodellen eine vermehrte Nahrungsaufnahme (Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Bhatti et al., 2006) und ein verminderter Fettstoffwechsel (Tschöp et al., 2000; Wortley et al., 2004; Zigman et al. 2005) festgestellt. Die Wirkung Ghrelins auf die Nahrungsaufnahme bzw. auf den Fettstoffwechsel ist von der Wirkung auf das Wachstumshormon unabhängig.

Die Integration Ghrelins in die Regulierung des Energiehaushaltes wurde über folgende Studien belegt, die hauptsächlich den Plasmaspiegel Ghrelins bezogen auf die Energiebilanz betrachten: Tschöp et al. (2001) untersuchten zum ersten Mal bei übergewichtigen Menschen die Ghrelinkonzentrationen und konnten niedrigere Konzentration im Vergleich zu normalgewichtigen feststellen. Von erhöhten Ghrelin-Plasmaspiegel bei anorektischen Patienten berichteten Otto et al. (2001). In weiteren Studien wurde die Plasmakonzentration von Ghrelin vor und nach Mahlzeiten, bzw. vor und nach Magen-Bypass-Operationen aufgeführt (Cummings et al., 2002). Ghrelinspiegel stiegen bei diätinduzierter Gewichtsabnahme (nicht bei Gewichtsverlust nach OP) und fielen bei Gewichtszunahme (Cummings et al., 2002). Die Konzentration Ghrelins im Plasma spiegelt die Energiebilanz wieder. Die anabole Wirkung Ghrelins bezog Couce et al. (2006) vor allem auf die Konzentration von Ghrelin im zentralen Nervensystem.

Ukkola et al. (2001) und Korbonits et al. (2002) untersuchten die DNA-Sequenz des *Ghrelin-Gens* auf mögliche Mutationen und Polymorphismen. Korbonits et al. (2002) konnte in ihrer Studie eine signifikante Assoziation zwischen dem Leu-72-Met Polymorphismus und einem höheren BMI bei Kindern ($p = 0,001$) sowie mit niedrigeren Insulinsekretionwerten während des oralen Glucose-Toleranz-Testes ($p = 0,05$) nachweisen. Ukkola et al. (2001) belegten in ihrer Studiengruppe einen früheren Beginn der (selbst angegebenen) Gewichtsprobleme bei Mutationsträgern.

Ukkola et al. (2001) wiesen auch dem Arg-51-Gln Polymorphismus eine positive Assoziation für Adipositas nach. In der Kontrollgruppe von Ukkola et al. (2001) konnte kein Polymorphismusträger nachgewiesen werden.

5.1.2 Ergebnisbewertung

Um mögliche funktionsrelevante Mutationen zum Phänotyp Adipositas zu detektieren, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Mutationssuche in der kodierenden Region des *Ghrelin-Gens*. Die Studiengruppen bestanden initial aus 215 adipösen Kindern und Jugendlichen, 93 normalgewichtigen Studenten und wurde mit 134 untergewichtigen Studenten und weiteren 44 normalgewichtigen Erwachsenen erweitert (siehe Tabelle 2.1). Die Kombination von SSCP mit Sequenzierung hat sich zur Identifikation von Sequenzvarianten bewährt. Es besteht eine geringe Möglichkeit, dass über unsere angewandte Methode funktionsrelevante Mutationen für Adipositas im *Ghrelin-Gen* nicht detektiert wurden.

Wir identifizierten fünf Sequenzvarianten (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1). Es wurden zwei bis zu unserer Arbeit unveröffentlichte Deletionen (2 bp-Deletion mit Frameshift und 1 bp-Deletion im Intron) und ein neuer Gln-90-Met Polymorphismus gefunden. Zwei der detektierten SNPs, Arg-51-Gln und Leu-72-Met, waren bereits bekannt (Ukkola et al. 2001; Korbonits et al., 2002). Vier der detektierten Varianten haben Einfluss auf die Proteinsequenz des *Pre-Pro-Ghrelins* und zwei auf das biologisch aktive *Ghrelin*. Die Polymorphismen wurden als Marker für Assoziationsstudien eingesetzt.

Die Frameshift-Mutation fand sich ausschließlich bei einem normalgewichtigen Probanden, die 1 bp-Deletion im ersten Intron nur bei einem adipösen Probanden. Da die 1 bp-Deletion im Intron liegt gehen wir davon aus, dass diese Mutation keinen Einfluss auf die Pathogenese von Adipositas hat. Die Mutation könnte noch in einem Kopplungsungleichgewicht mit einer

funktionsrelevanten Mutation liegen (siehe 3.8.1.1). Es fand sich jedoch bei dem Mutationsträger im untersuchten Genabschnitt keine weitere Sequenzvariante.

Bei dem normalgewichtigen Probanden mit der Frameshift-Mutation wurden die Ursachen bezüglich des Normalgewichtes genauer untersucht. Eine Haplo-Insuffizienz ist höchst wahrscheinlich, da wir keine Auffälligkeiten weder bezüglich des Essverhaltens noch hinsichtlich der Gewichtsentwicklung bei dem Probanden finden konnten. Eine Haplo-Insuffizienz kann daher mit einem normalen Gewicht einhergehen.

Die Ergebnisse der drei durchgeführten Assoziationsstudien belegen allenfalls eine geringe Beteiligung der untersuchten Polymorphismen am Phänotyp Adipositas. Im Gegensatz zu Ukkola et al. (2001), Korbonits et al. (2002) und Steinle et al. (2005) konnten wir keine signifikante Assoziation zu den zwei Polymorphismen Arg-51-Gln und Leu-72-Met bestätigen. Die Allelverteilung war in allen Studiengruppen (extrem Adipöse, Normalgewichtige und Untergewichtige) gleich (siehe Tabelle 4.3). Auch der zunächst signifikante Unterschied in der Allelfrequenz zwischen Adipösen und Normalgewichtigen für den neu identifizierten Gln-90-Leu Polymorphismus konnte nach Erweiterung der Studiengruppen nicht bestätigt werden. Es muss bei dem zuerst signifikanten Unterschied in der Allelfrequenz von einer falsch positiven Assoziation ausgegangen werden.

Für uns folgte hieraus, dass keine der detektierten Sequenzvarianten in unserer Studiengruppe für die Pathogenese von Adipositas relevant waren.

5.1.3 Befunde anderer Arbeitsgruppen zu den Polymorphismen Arg-51-Gln & Leu-72-Met

Ukkola et al. (2001) berichteten als erste von einer Basensubstitution an Position 152 (G→A) im *Ghrelin-Gen*. Sie untersuchten diese Sequenzvariante mittels RFLP-PCR in einer Studiengruppe aus 96 adipösen und 96 normalgewichtigen Probanden. Das A-Allel wurde bei sechs Adipösen und keinem der normalgewichtigen Kontrollen detektiert. Es lag eine signifikante Assoziation des Arg-51-Gln Polymorphismus zum Phänotyp Adipositas vor ($p < 0,05$). Unter den Mutationsträgern war das selbst angegebene Gewicht im Alter von 20, 30 und 40 Jahren im Vergleich zu den adipösen Wildtypträgern um 7,5; 4,7 und 6,4 kg niedriger.

In der gleichen Studie wurde der Polymorphismus Leu-72-Met zum ersten Mal in Verbindung mit Adipositas gesetzt. Das A-Allel an Position 214 wurde bei 15 Adipösen und 12 Personen

einer Kontrollgruppe entdeckt. Dabei wiesen drei der adipösen und keiner der normalgewichtigen Probanden ein homozygotes Muster auf. Der Beginn der Adipositas trat bei adipösen Mutationsträger tendenziell früher ein (15,6 +/- 7,9 Jahre versus 20,5 +/- 10,5 Jahre; $p = 0.09$).

Zum gleichen Polymorphismus (Leu-72-Met) wurde 2002 von Korbonits et al. eine Studie veröffentlicht, die ebenfalls eine signifikante Assoziation zum Phänotyp Adipositas postulierte. Die Stichprobe bestand aus 70 adipösen und 70 schlanken Kindern. Es wurden zehn SNPs detektiert. Nur der 214 C>A SNP erbrachte ein signifikantes Ergebnis bezüglich eines höheren BMI ($p = 0,001$) und einer niedrigeren Insulinsekretion während der ersten Phase eines oralen Glukose-Toleranz-Testes ($p = 0,05$). Auch hier wurde unter den Mutationsträgern ein niedrigeres Alter bei der Übergewichtsentwicklung angegeben (2 Jahre versus 3,5 Jahre; $p = 0,036$).

In einer zweiten, größeren Studie (3004 Probanden aus der Québec Family Study (QFS), der HERITAGE Family Study und der Swedish Obese Study (SOS)) untersuchten Ukkola et al. (2002) nochmals die zwei assoziierten Polymorphismen und kamen zu folgenden Ergebnissen: Alle Studiengruppen ergaben nur einen signifikanten Wert: homozygote A-Allelträger an Position 214 (Met-72) hatten einen BMI unter 25 kg/m^2 ($p < 0,05$). Weitere signifikante Ergebnisse wurden nur erreicht, wenn die Studiengruppen getrennt voneinander betrachtet wurden (siehe Tabelle 5.1). Zusammengefasst kann man schlussfolgern, dass die zuvor belegte Assoziation von Ukkola bezüglich der SNPs Arg-51-Gln und Leu-72-Met zu Adipositas, bzw. den frühen Beginn der Übergewichtsentwicklung nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die nachträgliche Aufteilung der Studiengruppen anhand weiterer Kategorien (beispielsweise Hautfarbe der Probanden) birgt das Risiko einer Scheinassoziation.

Korbonits und Ukkola wiesen den Polymorphismus Gln-90-Leu sowie die zwei Deletionsmutationen nicht auf, da sie ‚nur‘ den kodierenden Bereich des reifen Ghrelins analysierten.

In den von uns untersuchten Stichproben wurde die Assoziation der zwei Polymorphismen (Arg-51-Gln und Leu-72-Met) zum Phänotyp Adipositas nicht bestätigt. Dieses Ergebnis könnte auf eine unterschiedliche Allelverteilung der Polymorphismen in den verschiedenen Studiengruppen hinweisen. Die BMI-Richtwerte der Stichgruppen der verschiedenen Studien unterschieden sich kaum: Für die adipöse Stichgruppe (BMI-Perzentile >90 und BMI im Mittel bei 40 kg/m^2) und für die normalgewichtigen Kontrollen (BMI im Mittel bei 22 kg/m^2).

Doch sind die Studiengruppen nicht nach identischen Kriterien ausgewählt worden. Die Probanden der Gruppe von Ukkola et al. (2001) waren ausschließlich weiblich, Altersangaben fehlten. Korbonits et al. (2002) erwähnten das Geschlecht der Probanden nicht, deren Alter durchschnittlich bei 9,4 Jahren lag. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Geschlechter untersucht, das mittlere Alter der adipösen Probanden lag bei 15,3 Jahren (siehe Tabelle 2.1).

Wie schon kritisch zu der Studie von Ukkola et al. (2002) angemerkt, lag bei den signifikanten Ergebnissen stets eine spezielle Auswahl der Studiengruppe vor. Erweiterte man die Studiengruppen, z. B. mit Einschließen von beiden Geschlechtern oder mit Hinzuziehen von anderen Gewichtsklassen, relativierten sich die Ergebnisse/Allelfrequenzen und es konnte keine signifikante Assoziation bestätigt werden (siehe 5.3.2. ‚Zufällige Fehler‘).

SNP	Studiengruppen	Assoziation	5.2 Referenz
Arg-51-Gln	96 adipöse Frauen	$p < 0,05$	Ukkola et al., 2001
	96 normalgewichtige Frauen	(Adipositas)	
	3004 Probanden aus der Québec Family Study (QFS), der HERITAGE Family Study, der Swedish Obese Study (SOS)	$p < 0,05$ (BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$)	Ukkola et al., 2002
	homozygote A-Allelträger	$p = 0,007$ (niedrige Ghrelin-Plasmaspiegel)	
	215 extrem adipöse Kindern und Jugendliche	Keine $p = 0,83$	Hinney et al., 2002
Leu-72-Met	93 normalgewichtige Kontrollen		
	96 adipöse Frauen	Keine	Ukkola et al., 2001
	96 normalgewichtige Frauen	$p = 0,09$	
	homozygote C-Allelträger Probanden der SOS-Gruppe	$p < 0,05$ (BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$)	Ukkola et al., 2002
	dunkelhäutige Probanden der QFS-Gruppe und der HERITAGE-Gruppe	$p = 0,026$ (weniger Fettmasse) $p = 0,019$ (höheren Insuli-like growth factor 1-Spiegel)	
	70 extrem adipöse Kindern	$p = 0,001$	Korbonits et al., 2002
	70 schlanken Kindern	(Adipositas) $p = 0,05$ (Insulinsekretion)	
		$p = 0,036$ (früher Beginn der Adipositasentw.)	
	215 extrem adipöse Kindern und Jugendlichen	Keine $p = 0,84$	Hinney et al., 2002
	93 normalgewichtige Kontrollen		

Tab. 5.1: Vergleich der veröffentlichten Studien über die SNPs Arg-51-Gln und Leu-72-Met im Ghrelin-Gen bezüglich Assoziation zum Phänotyp Adipositas.

5.3 Kandidatengenansatz zur Identifizierung beteiligter Allele

5.3.1 Bewertung des Kandidatengenansatzes

Tiermodelle weisen auf den Beitrag eines Kandidatengens zur Genese eines Phänotyps bzw. Pathogenese einer Krankheit hin. In dieser Studie wurde das Kandidatengen *Ghrelin* auf die Beteiligung an der Pathogenese von Adipositas untersucht. Dabei wurde nach funktionsrelevanten Mutationen gesucht und auf Assoziation überprüft. Wir haben den kodierenden Bereich des *Ghrelin*-Gens untersucht. Es wurden zwei seltene genetische Sequenzvarianten und drei Polymorphismen detektiert.

Weiterführende Analysen wären dann erfolgt, wenn ein Allel signifikant häufiger in einer Studiengruppe gefunden worden wäre. Dies war zwar für den Polymorphismus im dritten Exon Gln-90-Leu mit der initialen Studiengruppe zutreffend, nach Erweiterung der Studiengruppe konnte eine Assoziation zum Phänotyp Adipositas jedoch nicht mehr nachgewiesen werden.

Bis zur Veröffentlichung unserer Studie war eine Arbeit über eine mögliche Assoziation zweier Polymorphismen im *Ghrelin*-Gen zum Phänotyp Adipositas publiziert (Ukkola et al., 2001). Die Studie ergab eine signifikante Assoziation des SNPs Arg-51-Gln zum Phänotyp Adipositas. Für den Polymorphismus im dritten Exon lag derzeit noch keine Studie vor.

5.3.2 Bewertung von klassischen Fall-Kontrollstudien

Um zuverlässige Angaben über den Zusammenhang von Varianten im *Ghrelin*-Gen und dem Phänotyp Adipositas zu machen, wurden die drei Polymorphismen (Arg-51-Gln, Leu-72-Met, Gln-90-Leu) als Marker für Assoziationsstudien eingesetzt. Die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse ist neben methodischen Fehlern auch abhängig vom Umfang und Qualität der Stichproben. Bei der Rekrutierung der Probanden wurde großer Wert auf klare Unterschiede im BMI, bzw. in der BMI-Perzentile gelegt. Zudem wurde versucht alle Faktoren, die das Körpergewicht beeinflussen könnten, auszuschließen (siehe 2.1.2). Die Gewichtsklasse sollte der einzige Unterschied zwischen den verschiedenen Studiengruppen darstellen. Diese Vorgaben wurden eingehalten um systematische Fehler zu vermeiden. Unter systematische Fehler zählt man solche, die auch durch größere Stichproben nicht verringert werden können (Schäfer, 1998). Ein solcher Fehler wäre aufgetreten, wenn in der Studie z. B. tendenziell häufiger adipöse Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 und normalgewichtige ohne diese

Stoffwechselkrankheit aufgenommen worden wären. Zufällige Fehler sind die Fehler, die durch eine Vergrößerung der Studiengruppe reduziert werden können (Schäfer, 1998). Aufgrund der Heterogenität der Genloci sollte die Fallzahl einer genetischen Studie ausreichend groß sein, nur dadurch besteht die Möglichkeit auch Varianten mit geringeren Allelfrequenzen detektieren zu können. In den initial untersuchten Studiengruppen (215 Adipöse und 93 Normalgewichtige) konnten zwei seltene genetische Varianten und drei Polymorphismen identifiziert werden. Zur Untersuchung des Polymorphismus im dritten Exon wurde die Studiengruppe mit 134 untergewichtigen Studenten und 44 normalgewichtigen Erwachsenen vergrößert.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Anand B.K., Brobeck J.R.: Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1951**, 77: 323-324.
- Ankersen M., Hansen T.K., Ahnfelt-Rønne I., Kappelgaard A.M.: Growth hormone secretagogues: recent advances and applications, *DDT* **1999**, 4: 497-506.
- Arora S., Anubhuti: Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides* **2006**, 6: 375-401.
- Arvat E., Gianotti L., Di Vito L., Imbimbo B.P., Lenaerts V., Deghenghi R., Camanni F., Ghigo E.: Modulation of growth hormone-releasing activity of hexarelin in man. *Neuroendocrinology.* **1995**, 61: 51-56.
- Barsh G.S., Farooqi S., O'Rahilly St.: Genetics of body-weight regulation. *Nature* **2000**, 404: 644-651.
- Bell C.G., Walley A.J., Froguel P.: The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 2005, 6: 221-234.
- Bhatti S.F., Hofland L.J., van Koetsveld P.M., van Ham L.M., Mol J.A., van der Lely A.J., Kooistra H.S.: Effects of food intake and food withholding on plasma ghrelin concentrations in healthy dogs. *Am J Vet Res* **2006**, 67: 1557-1563.
- Birbaumer N., Schmidt R. F.: Biologische Psychologie, *Springerverlag*, Berlin u.a., **1996**, S.: 615f.
- Böddeker I., Ziegler A.: Assoziations- und Kopplungstudien zur Analyse von Kandidatengenen, *Dtsch Med Wschr* **2000**, 125: 810-815.
- Bouchard C., Pérusse L.: Genetic aspects of obesity. *Ann N Y Acad Sci* **1993**, 699: 26-35.
- Bouchard C., Pérusse L., Rice T., Rao D.C.: The genetics of human obesity. In Bray G.A., Bouchard C., James W.P.T.(Hrsg): Handbook of obesity. *Marcel Dekker Inc.*, New York, Basel, Honkong, **1997**.
- Bray G.A., Tartaglia L.A.: Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* **2000**, 404: 672-677.
- Britz B., Siegfried W., Ziegler A., Lamertz C., Herpertz-Dahlmann B.M., Renschmidt H., Wittchen H.U., Hebebrand J.: Rates of psychiatric disorders in a clinical study group of adolescents with extreme obesity and in obese adolescents ascertained via a population based study. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2000**, 24:1707-1714.
- Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C.: Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Hum Genet* **1991**, 48: 137-144.
- Bultmann S.J., Michaud E.J., Woychik R.P.: Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* **1992**, 71: 1195-1204.
- Calle E.E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun M.J.: Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. Adults. *N Engl J Med* **2003**, 348: 1625-1638.
- Challis B.G., Pritchard L.E., Creemers J.W., Delplanque J., Keogh J.M., Luan J., Wareham N.J., Yeo G.S., Bhattacharyya S., Froguel P., White A., Farooqi I.S., O'Rahilly S.: A missense mutation

- disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* **2002**, 11: 1997-2004.
- Chen H., Charlat O., Tartaglia L.A., Woolf E.A., Weng X., Ellis S.J., Lakey N.D., Culpepper J., Moore K.J., Breitbart R.E., Duyk G.M., Tepper R.I., Morgenstern J.P.: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* **1996**, 84: 491-495.
- Chen A.S., Metzger J.M., Trumbauer M.E., Guan X., Yu H., Frazier E.G., Marsh D.J., Forrest M.J., Gopal-Truter S., Fisher J., Camacho R.E. Strack A.M., Mellin T.N., MacIntyre D.E., Chen H.Y., Van der Ploeg L.H.T.: Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Research* **2000**, 9: 145-154.
- Cole T.J., Green P.J.: Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med.* **1992**, 11: 1305-1319.
- Collins D.W., Jukes T.H.: Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics* **1994**, 20: 386-396.
- Cone R. et al.: The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* **1996**, 51: 287-317.
- Cooper D.N., Krawczak M.: The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet* **1990**, 85: 55-74.
- Cooper D.N., Krawczak M.: The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet* **1990**, 85: 55-74.
- Cotton R.G.H., Malcolm A.D.B.: Mutation detection. *Nature* **1991**, 353: 582-583.
- Couce M.E., Cottam D., Esplen J., Teijeiro R., Schauer P., Burguera B.: Potential role of hypothalamic ghrelin in the pathogenesis of human obesity. *J Endocrinol Invest* **2006**, 7: 599-605.
- Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E., Weigle D.S.: A preprandial rise in plasma Ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **2001**, 50: 1714-1719.
- Cummings D.E., Weigle D.S., Frayo R.S., Breen P.A., Ma M.K., Dellinger E.P., Purnell J.Q.: Plasma Ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* **2002**, 346: 1623-1630.
- Daniels S.R., Khoury P.R., Morrison J.A.: The utility of body mass index as a measure of body fatness in children and adolescents: differences by race and gender. *Pediatrics* **1997**, 99: 804-807.
- Date Y., Murakami N., Kojima M., Kuroiwa T., Matsukura S., Kangawa K., Nakazato M.: Central Effects of a Novel Acylated Peptide, Ghrelin, on Growth Hormone Release in Rats. *Biochem and Biophys Res Commun* **2000**, 275: 477-480.
- Delparigi A., Tschop M., Heiman M.L., Salbe A.D., Vozarova B., Sell S.M., Bunt J.C., Tataranni P.A.: High circulating Ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocr Metab* **2002**, 87: 5461-5464.
- Demerais F., Lathrop G.M., Lalouel J.M.: Detection of linkage between a quantitative trait and a marker locus by the lod score method: sample size and sampling considerations. *Hum Genet* **1988**, 52: 237-246.
- Deutsche Adipositas-Gesellschaft: <http://www.adipositas-gesellschaft.de>
- Dhillon W.S.: Appetite regulation: an overview. *Thyroid* **2007**, 5: 433-445.

- Donahue L.R., Beamer W.G.: Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J Endocrinol* **1993**, 136: 91-104.
- Doucet E., Cameron J.: Appetite control after weight loss: what is the role of bloodborne peptides? *Appl Physiol Nutr Metab* **2007**, 3: 523-532.
- Ehrlich H.A.: PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. *Stockton Press, New York* **1989**.
- Elmqvist J.K., Elias C.F., Saper C.B.: From lesions to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **1999**, 22: 221-232.
- Farooqi I.S., Yeo G.S., Keogh J.M., Aminian S., Jebb S.A., Butler G., Cheetham T., O'Rahilly S.: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* **2000**, 106: 271-279.
- Flegal K.M., Carroll M.D., Ogden C.L., Johnson C.L.: Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* **2002**, 288: 1723-1727.
- Friedman J.M.: A war on obesity, not the obese. *Science* **2003**, 299: 856-858.
- Flier J.S., Maratos-Flier E.: Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* **1998**, 92: 437-440.
- Friboes R.M., Murck H., Maier P., Schier T., Holsboer F., Steiger A.: Growth hormone-releasing peptide-6 stimulates sleep, growth hormone, ACTH and cortisol release in normal man. *Neuroendocrinology* **1995**, 61: 584-589.
- Funakoshi A., Shinozaki H., Masada M., Kawanami T., Takata Y., Kono A.: An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystikinin (CCK)-A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, 210: 787-796.
- Garrow J.S., Webster J.: Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *Int J Obes* **1985**, 9: 147-153.
- Gelber R.P., Kurth T., Manson J.E., Buring J.E., Gaziano J.M.: Body mass index and mortality in men: evaluating the shape of the association. *Int J Obes* **2007**, advance online publication.
- Gibbs W.W.: Übergewicht: ein Zivilisationsproblem? *Spektrum der Wissenschaft* **1996**, 54-63.
- Glavac D., Dean M.: Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* **1993**, 2: 404-414.
- Gray D.S., Bray G.A., Gemayel N., Kaplan K.: Effect of obesity on bioelectrical impedance. *Am J Clin Nutr.* **1989**, 50: 255-260.
- Gunn T.M., Miller K.A., He L., Hyman R.W., Davis R.W., Azarani A., Schlossman S.F., Duke-Cohan J.S., Barsh G.S.: The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin. *Nature* **1999**, 398: 152-156.
- Hager J., Dina C., Francke S., Dubois S., Houari M., Vatin V., Vaillant E., Lorentz N., Basdevant A., Clement K., Guy-Grand B., Froguel P.: A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* **1998**, 20: 304-308.
- Hakansson M.L., Hulting A.L., Meister B.: Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus-relationship with NPY neurones. *Neuroreport* **1996**, 7: 3087-3092.
- Hansen T.K., Dall R., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Christiansen J.S., Jørgensen J.O.: Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2002**, 56: 203-206.

- Haqq A. M., Farooqi I. S., O'Rahilly S., Stadler D. D., Rosenfeld R. G., Pratt K. L., LaFranchi S. H., Purnell J. Q.: Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocr Metab* **2003**, 88: 174-178.
- Hayashi K.: PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* **1991**, 1: 34-38.
- Hebebrand J., Hinney A., Klug J.: Neue molekularbiologische Befunde zur Regulation des Körpergewichts. *Biospektrum* **1995a**, 3: 30-32.
- Hebebrand J., Rembrand H.: Das Körpergewicht unter genetischen Aspekten. *Medizinische Klinik* **1995b**, 90: 403-410.
- Hebebrand J., Hinney A., Roth H., Ziegler A.: Genetische Aspekte der Adipositas. *Wechsler JG* (Hrsg.) Adipositas/Ursachen und Therapie. **1998**, 105-117.
- Hetherington A.W., Ranson S.W.: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* **1940**, 78: 149-172.
- Hinney A., Lentjes K.U., Rosenkranz K., Barth N., Roth H., Ziegler A., Hennighausen K., Coners H., Wurmser H., Jacob K., Romer G., Winnikes U., Mayer H., Herzog W., Lehmkuhl G., Poustka F., Schmidt M.H., Blum W.F., Pirke K.M., Schäfer H., Grzeschik K.H., Remschmidt H., Hebebrand J.: Beta 3-adrenergic-receptor allele distributions in children, adolescents and young adults with obesity, underweight or anorexia nervosa. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1997a**, 21: 224-230.
- Hinney A., Rosenkranz K., Roth H., Hebebrand J.: Gene in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. *Adipositas* **1997b**, 13: 6-12.
- Hinney A., Becker I., Heibult O., Nottebom K., Schmidt A., Ziegler A., Mayer H., Siegfried W., Blum W.F., Remschmidt H., Hebebrand J.: Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *J Clin Endocr Metab* **1998**, 83: 3737-3741.
- Hinney A., Schmidt A., Nottebom K., Heilbütt O., Becker I., Ziegler A., Gerber G., Sina M., Görg T., Mayer H., Siegfried W., Fichter M., Remschmidt H., Hebebrand J.: Several mutations in the melanocortin-4-receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocr Metab*. **1999**, 84: 1483-1486.
- Hinney A., Hebebrand J.: Neue Erkenntnisse zu genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation. *Pädiat Praxis* **2001**, 59: 373-379.
- Hinney A., Hebebrand J., Sommerlad C., Geller F., Gorg T.: The genetics of obesity: practical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2001**, 25: 8-10.
- Hinney A., Hohmann S., Geller F., Vogel C., Hess C., Wermter A.K., Brokamp B., Goldschmidt H., Siegfried W., Remschmidt H., Schafer H., Gudermann T., Hebebrand J.: Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, 88: 4258-4267.
- Hinney A., Ziegler A., Oeffner F., Wedewardt Ch., Vogel M., Wulftange H., Geller F., Stübbling K., Siegfried W., Goldschmidt H.P., Remschmidt H., Hebebrand J.: Independent confirmation of a major locus for obesity on chromosome 10. *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, 85: 2962-2965.
- Hinney A., Bettecken T., Tarnow P., Brumm H., Reichwald K., Lichtner P., Scherag A., Nguyen T.T., Schlumberger P., Rief W., Vollmert C., Illig T., Wichmann H.E., Schafer H., Platzer M., Biebertmann H., Meitinger T., Hebebrand J.: Prevalence, spectrum, and functional characterization

- of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* **2006**, 91: 1761-1769.
- Holland A.J., Sicotte N., Treasure J.: Anorexia nervosa: evidence for a genetic basis. *J Psychosom Res* **1988**, 32: 651-571.
- Howard A.D., Feighner S.D., Cully D.F., Arena J.P., Liberatore P.A., Rosenblum C.I., Hamelin M., Hreniuk D.L., Palyha O.C., Anderson J., Paress P.S., Diaz C., Chou M., Liu K.K., McKee K.K., Pong S.S., Chaung L.Y., Elbrecht A., Dashkevich M., Heavens R., Rigby M., Sirinathsinghji D.J., Dean D.C., Melillo D.G., Van der Ploeg L.H., et al.: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **1996**, 273: 974-977.
- Hung T., Mak K., Fong K.: A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **1990**, 18: 4953.
- Huszar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V., Dunmore J.H., Fang Q., Berkemeier L.R., Gu W., Kesterson R.A., Boston B.A., Cone R.D., Smith F.J., Campfield L.A., Burn P., Lee F.: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **1997**, 88: 131-141.
- Inui A.: Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol Sci* **1999**, 20: 43-46.
- Jacks T., Hickey G., Judith F., Taylor J., Chen H., Krupa D., Feeney W., Schoen W., Ok D., Fisher M.: Effects of acute and repeated intravenous administration of L-692,585, a novel non-peptidyl growth hormone secretagogue, on plasma growth hormone, IGF-1, ACTH, cortisol, prolactin, insulin, and thyroxine levels in beagles. *J Endocrinol* **1994**, 143: 399-406.
- Jackson R.S., Creemers J.W., Ohagi S., Raffin-Sanson M.L., Sanders L., Montague C.T., Hutton J.C., O'Rahilly S.: Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* **1997**, 16: 303-306.
- Jequier E.: Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. **2002**, 967: 379-388.
- Jequier E.: Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2002**, 26: 7-12.
- Jones J.M., Meisler M.H., Seldin M.F., Lee B.K., Eicher E.M.: Localization of insulin-2 (Ins-2) and the obesity mutant tubby (tub) to distinct regions of mouse chromosome 7. *Genomics* **1992**, 14: 197-199.
- Kalra P.S., Dube M.G., Kalra S.P.: Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res* **1999**, 842: 473-477.
- Kawano H., Honma S., Honma A., Horie M., Kawano Y., Hayashi S.: Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding. *Anat Sci Int* **2002**, 77: 149-160.
- Kessler C., Neumaier P.S., Wolf W.: Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases - a review. *Gene* **1985**, 33: 1-102.
- Kim K., Arai K., Sanno N., Osamura R.Y., Teramoto A., Shibasaki T.: Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHSR) mRNA expression in human pituitary adenomas. *Clin Endocr (Oxf)* **2001**, 54: 759-768.
- Kineman R.D., Luque R.M.: Evidence that ghrelin is as potent as GHRH in releasing GH from primary pituitary cell cultures of a non-human primate (*Papio anubis*), acting through intracellular signaling pathways distinct from GHRH. *Endocrinology* **2007**, 5.
- Kleyn P.W., Fan W., Kovats S.G., Lee J.J., Pulido J.C., Wu Y., Berkemeier L.R., Misumi D.J., Holmgren L., Charlat O., Woolf E.A., Tayber O., Brody T., Shu P., Hawkins F., Kennedy B., Baldini L., Ebeling C., Alperin G.D., Deeds J., Lakey N.D., Culpepper J., Chen H., Glucksmann-Kuis M.A., Moore K.J.: Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby: a

- member of a novel gene family. *Cell* **1996**, 85: 281-290.
- Knippers R.: Molekulare Genetik. *Georg Thieme Verlag* **1997**, 7. Auflage: S. 38.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **1999**, 402: 656-660.
- Kojima M., Hosoda H., Matsuo H., Kangawa K.: Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* **2001**, 12: 118-122.
- Korbonits M., Gueorguiev M., O'Grady E., Lecoecur C., Swan D.C., Mein C.A., Weill J., Grossman A.B., Froguel P.: A variation in the Ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J Clin Endocr Metab* **2002**, 87: 4005-4008.
- Krawczak M., Cooper D.N.: Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* **1991**, 86: 425-441.
- Kromeyer-Hauschild K., Wabitsch M., Geller F., Ziegler A., Geiß H.C., Hesse V., v. Hippel, Jaeger U., Johnsen D., Kiess W., Korte W., Kunze D., Menner K., Müller M., Niemann-Pilatus A., Remer Th., Schaefer F., Wittchen H.U., Zabransky S., Zellner K., Hebebrand J.: Perzentile für den Body Mass Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde* **2001**, 149: 807-818.
- Krude H., Biebermann H., Luck W., Horn R., Brabant G., Grüters A.: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* **1998**, 19: 155-157.
- Krude H., Grüters A.: Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: The POMC Deficiency Syndrome. *TEM* **2000**, 1:15-22.
- Kurth B.M., Schaffrath Rosario A.: The prevalence of overweight and obese children and adolescents living in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **2007**, 50: 736-43.
- Kuslich C.D., Kobori J.A., Mohapatra G., Gregorio-King C., Donlon T.A.: Prader-Willi syndrome is caused by disruption of the SNRPN gene. *Am J Hum Genet* **1999**, 64: 70-76.
- Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J.J.: Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res* **1990**, 18: 999-1005.
- Lander E.S., Kruglyak L.: Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **1995**, 11: 241-247.
- Lander E.S., Schork N.J.: Genetic Dissection of complex traits. *Science* **1994**, 265: 2037-2048.
- Lányi E., Csernus K., Erhardt E., Tóth K., Urbán B., Lénárd L., Molnár D.: Plasma levels of acylated ghrelin during an oral glucose tolerance test in obese children. *J Endocrinol Invest* **2007**, 2: 133-137.
- Lawrence C.B., Turnbull A.V., Rothwell N.J.: Hypothalamic control of feeding. *Curr Opin Neurobiol* **1999**, 9: 778-783.
- Locke W., Kirgis H.D., Bowers C.Y., Abdoh A.A.: Intracerebroventricular growth-hormone-releasing peptide-6 stimulates eating without affecting plasma growth hormone responses in rats. *Life Sci* **1995**, 56: 1347-1352.
- Lu D., Willard D., Patel I.R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., Woychik R.P., Wilkison W.O., Cone R.D.: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* **1994**, 371: 799-802.

- Maes H.H., Neale M.C., Eaves L.J.: Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* **1997**, 27: 325-351.
- Mancini M.C., Halpern A.: Investigational therapies in the treatment of obesity. *Expert Opin Investig Drugs* **2006**, 8: 897-915.
- Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., Ohnuma N., Tanaka S., Itoh Z., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K.: Ghrelin Stimulates Gastric Acid Secretion and Motility in Rats. *Biochem and Biophys Res Commun* **2000**, 276: 905-908.
- McGinnis J.M., Foege W.H.: Actual causes of death in the United States. *JAMA* **1993**, 270: 2207-2212.
- Medlund P., Cederlof R., Floderus-Myrhed B., Friberg L., Sorensen S.: A new Swedish twin registry. *Acta Med Scand* **1976**, 600: 1-111.
- Melmer G.: Methoden und Möglichkeiten der DNA-Diagnostik. *Ärztliches Laboratorium* **1991**, 36: 17-26.
- Mercer J.G. et al.: Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* **1996**, 387: 113-116.
- Micozzi M.S., Albanes D., Jones D.Y., Chumlea W.C.: Correlations of body mass index with weight, stature, and body composition in men and women in NHANES I and II. *Am J Clin Nutr* **1986**, 44: 725-731.
- Mijailovic M., Mijailovic V., Micic D.: Childhood onset of obesity: does an obese child become an obese adult? *J Pediatr Endocr Metab* **2001**, 14: 1335-1338.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **1988**, 16: 1215.
- Moll P.P., Burns T.L., Lauer R.M.: The genetic and environmental sources of body mass index variability: the Muscatine Ponderosity Family Study. *Am J Hum Genet* **1991**, 49: 1243-1255.
- Momany F.A.: Conformational analysis of methionine-enkephalin and some analogs. *Biochem Biophys Res Commun* **1977**, 75: 1098-1103.
- Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Sewter C.P., Digby J.E., Mohammed S.N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R., Barnett A.H., Prins J.B., O'Rahilly S.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **1997**, 387: 903-908.
- Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* **1987**, 155: 335.
- Mullis K.B.: The unusual Origin of the origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific american* **1990**, 262: 56-61.
- Naggert J.K., Fricker L.D., Varlamov O., Nishina P.M., Rouille Y., Steiner D.F., Carroll R.J., Paigen B.J., Leiter E.H.: Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* **1995**, 10: 135-142.
- Nagle D.L., McGrain S.H., Vitale J., Woolf E.A., Dussault B.J.jr., DiRocco L., Holmgren L., Montagno J., Bork P., Huszar D., Fairchild-Huntress V., Ge P., Keilty J., Ebeling C., Baldini L., Gilchrist J., Burn P., Carlson G.A., Moore K.J.: The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature* **1999**, 398: 148-152.
- Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., Matsukura S.: A role for

- Ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **2001**, 409: 194-198.
- Newton C.R., Graham A.: Wesentliche Prinzipien und Methoden, PCR, *Spektrum, Akademischer Verlag* **1997**, 2. Auflage: 19-49.
- Noben-Trauth K., Naggert J.K., North M.A., Nishina P.M.: A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature* **1996**, 380: 534-538.
- Ohta T., Gray T.A., Rogan P.K., Buiting K., Gabriel J.M., Saitoh S., Muralidhar B., Bilienska B., Krajewska-Walasek M., Driscoll D.J., Horsthemke B., Butler M.G., Nicholls R.D.: Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **1999**, 64:397-413.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H. Hayashi K., Sekiya T.: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* **1989**, 86: 2766-2770.
- Otto B., Cuntz U., Fruehauf E., Wawarta R., Folwaczny C., Riepl R.L., Heiman M.L., Lehnert P., Fichter M., Tschop M.: Weight gain decreases elevated plasma Ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocr* **2001**, 145: 669-73.
- Ozata M., Ozdemir I.C., Licinio J.: Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**, 84: 3686-3695.
- Pääbo S., Gifford J.A., Wilson A.C.: Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* **1988**, 16: 9775-9781.
- Papotti M., Ghe C., Cassoni P., Catapano F., Deghenghi R., Ghigo E., Muccioli G.: Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocr Metab* **2000**, 85: 3803-3807.
- Pérusse L., Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Argyropoulos G., Walts B., Snyder E.E., Boucard C.: The human obesity gene map: the 2004 update. *Obes Res* **2005**, 13: 381-490.
- Peterfy M., Phan J., Xu P., Reue K.: Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* **2001**, 27: 121-124.
- Phan L.K., Lin F., LeDuc C.A., Chung W.K., Leibel R.L.: The mouse mahoganoid coat color mutation disrupts a novel C3HC4 RING domain protein. *J Clin Invest* **2002**, 110: 1449-1459.
- Pietrobelli A., Faith M.S., Allison D.B., Gallagher D., Chiumello G., Heymsfeld S.B.: Body mass index as a measure of adiposity among children and adolescents: a validation study. *J Pediatr* **1998**, 132: 204-210.
- Pomp D.: Genetic dissection of obesity in polygenic animal models. *Behav Genet* **1997**, 27: 285-306.
- Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y.C., Weisnagel S.J., Argyropoulos G., Walts B., Perusse L., Bouchard C.: The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. **2006**, 14: 529-644.
- Ravussin E., Lillioja S., Knowler W.C., Christin L., Freymond D., Abbott W.G., Boyce V., Howard B.V., Bogardus C.: Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. *N Engl J Med* **1988**, 318: 467-72.
- Reinehr T., Wabitsch M.: Strukturierte Erfassung der Therapieangebote für adipöse Kinder und Jugendliche. *Monatsschrift Kinderheilkunde* **2003**, 151: 757-761.

- Risch N., Zhang H.: Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* **1995**, 268: 1584-1589.
- Riesner D., Henco K., Steger G.: TGGE: A method for the analysis of conformational transitions and mutations in nucleic acids and protein. In Crambach A, Dunn MJ, Radola BJ (Hrsg.): *Advances in Electrophoresis. VCH press* **1991**, 4: 169-250.
- Roberts S.B., Savage J., Coward W.A., Chew B., Lucas A.: Energy expenditure and intake in infants born to lean and overweight mothers. *N Engl J Med* **1988**, 318: 461-466.
- Rolland-Cachera M.F., Cole T.J., Sempe M., Tichet J., Rossignol C., Charraud A.: Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* **1991**, 45: 13-21.
- Sachs L.: *Angewandte Statistik: Planung und Auswertung; Methoden und Modelle. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York*, **1974**, 4. Auflage.
- Sanger F., Nicklen S., Coulsen A.R.: DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **1977**, 74: 5463-5467.
- Sarkar S., Kapelner S., Sommer S.S.: Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res* **1990**, 18: 7465.
- Sawchenko P.E.: Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* **1998**, 402: 435-441.
- Schäfer H.: *Biomathematik für Mediziner, Skript zur Vorlesung* **1998**, 2.überarbeitete Auflage: 12.
- Schaid D.J., Sommer S.S.: Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *Hum Genet* **1994**, 55: 402-409.
- Scheinert P., Schalk H.J., Kroll C.: Optimierung der PCR-Amplifikation komplexer Mischungen durch spezifitätssteigernde Additive und Temperaturgradienten-PCR. *Biotech* **1997**, 5: 54-55.
- Schimmel P.: Alanine transfer RNA synthetase: structure-function relationships and molecular recognition of transfer RNA. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1990**, 63: 233-270.
- Schwartz M.W., Seeley R.J., Campfield L.A., Burn P., Baskin D.G.: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* **1996**, 98: 1101-1106.
- Schwartz M.W., Peskind E., Raskind M., Boyko E.J., Porte D. Jr.: Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Med* **1996**, 2: 589-593.
- Schwartz G.J., Whitney A., Skoglund C., Castonguay T.W., Moran T.H.: Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol* **1999**, 277: 1144-1151.
- Schwartz M.W., Woods St.C., Porte D.Jr., Seeley R.J., Baskin D.G.: Central nervous system control of food intake. *Nature* **2000**, 404: 661-671.
- Scott A.F.: Personal Communication. *Baltimore, Md* **2000**, 10: 24.
- Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W., Stone E.M.: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* **1993**, 16: 325-332.
- Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hayashi T., Inoue G., Hosoda K., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.: Ghrelin, an Endogenous Growth Hormone Secretagogue, Is a Novel Orexigenic Peptide That Antagonizes Leptin Action Through the Activation of Hypothalamic Neuropeptide Y/Y1 Receptor Pathway. *Diabetes* **2001**, 50: 227-232.
- Shimada M., Tritos N.A., Lowell B.B., Flier J.S., Maratos-Flier E.: Mice lacking melanin-

- concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* **1998**, 396: 670-674.
- Sina M., Hinney A., Ziegler A., Neupert T., Mayer H., Siegfried W., Blum W.F., Remschmidt H., Hebebrand J.: Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *J Hum Genet* **1999**, 65: 1501-1507.
- Smith R.G., Cheng K., Schoen W.R., Pong S.S., Hickey G., Jacks T., Butler B., Chan W.W., Chaung L.Y., Judith F., et al.: A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* **1993**, 260: 1640-1643.
- Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J.: Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Hum Genet* **1993**, 52: 506-516.
- Spitzweg C., Hofbauer L.C., Landgraf R., Heufelder A.E.: Molekulare Pathogenese der Adipositas. *DMW* **1996**, 37: 1134-1138.
- Spyckerelle Y., Gueguen R., Guillemont M., Tosi E., Deschamps J.P.: Adiposity indices and clinical opinion. *Ann Hum Biol* **1988**, 15: 45-54.
- Steinle N. I., Pollin T. I., O'Connell J. R., Mitchell B. D., Shuldiner A. R.: Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the old order Amish. *J Clin Endocr Metab* **2005**, 90: 6672-6677.
- Stolovitzky G., Cecchi G.: Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, 93: 12947-12952.
- Strachan T. und Read A.P.: Human molecular genetics. *Spektrum Akademischer Verlag* **1996**.
- Strachan T. und Read A.P.: Human molecular genetics. *BIOS Scientific Publishers Ltd* **1999**, reprinted 2000.
- Strauss R.S., Must A.: Risks and consequences of childhood and adolescent obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1999**, 23: 2-11.
- Strobel A., Issad T., Camoin L., Ozata M., Strosberg A.D.: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* **1998**, 18: 213-215.
- Stunkard A.J., Foch T.T., Hrubec Z.: A twin study of human obesity. *JAMA* **1986**, 256: 51-54.
- Stunkard A.J., Harris J.R., Pedersen N.L., McClearn G.E.: The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* **1990**, 322: 1483-1487.
- Takaya K., Ariyasu H., Kanamoto N., Iwakura H., Yoshimoto A., Harada M., Mori K., Komatsu Y., Usui T., Shimatsu A., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.: Ghrelin strongly stimulates growth hormone (GH) release in humans. *J Clin Endocr Metab* **2000**, 85: 4908-4911.
- Tao Y.X., Segaloff D.L.: Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity. *Endocrinology* **2003**, 144: 4544-4551.
- Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., et al.: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **1995**, 83: 1263-1271.
- Tassone F., Broglio F., Gianotti L., Arvat E., Ghigo E., Maccario M.: Ghrelin and other gastrointestinal peptides involved in the control of food intake. *Mini Rev Med Chem* **2007**, 1: 47-53.
- Toshinai K., Mondal M.S., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Kojima M., Kangawa K., Matsukura

- S.: Upregulation of Ghrelin Expression in the Stomach upon Fasting, Insulin-Induced Hypoglycemia, and Leptin Administration. *Biochem and Biophys Res Commun* **2001**, 281: 1220-1225.
- Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L.: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **2000**, 407: 908-913.
- Tschöp M., Weyer C., Tataranni P.A., Devanarayan V., Ravussin E., Heiman M.L.: Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. *Diabetes* **2001**, 50: 707-709.
- Ukkola O., Ravussin E., Jacobson P., Snyder E.E., Chagnon M., Sjöström L., Couchard C.: Mutations in the PreproGhrelin/ Ghrelin Gene Associated with Obesity in Humans. *J Clin Endocr Metab* **2001**, 86: 3996-3999.
- Ukkola O., Ravussin E., Jacobson P., Perusse L., Rankinen T., Tschop M., Heiman M.L., Leon A.S., Rao D.C., Skinner J.S., Wilmore J.H., Sjöstrom L., Bouchard C.: Role of *Ghrelin* polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res* **2002**, 10: 782-791.
- Vaisse C., Clement K., Guy-Grand B., Froguel P.: A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* **1998**, 20: 113-114.
- Vaisse C., Clement K., Durand E., Hercberg S., Guy-Grand B., Froguel P.: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* **2000**, 106: 253-262.
- Wabitsch M., Kunze D., Keller E., Kiess W., Kromeyer-Hauschild K.: Obesity in children and adolescents in Germany. Significant and persistent increase of prevalence. Appeal to treatment *Fortschr Med Orig* **2002**, 120: 99-106.
- Wajnrach M.P., Ten I.S., Gertner J.M., Leibel R.L.: Genomic Organization of the Human GHRELIN Gene. *J Endocr Genet* **2000**, 1: 231-233.
- Watson P.E., Watson I.D., Batt R.D.: Obesity indices. *Am J Clin Nutr* **1979**, 32: 736-737.
- Weeks D.E., Lathrop G.M.: Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends in Genetics* **1995**, 11: 531-519.
- Whitaker R.C., Pepe M.S., Wright J.A., Seidel K.D., Dietz W.H.: Early adiposity rebound and the risk of adult obesity. *Pediatrics* **1998**, 101: E5.
- Whittemore A.S.: Genome scanning for linkage: an overview. *Hum Genet* **1996**, 59: 704-716.
- WHO: Composite International Diagnostic Interview (CIDI). a) CIDI Interview version 1.0, b) CIDI-user manual, c) CIDI-training manual, d) CIDI computer programs. *Geneva* **1990**.
- WHO: Obesity. Preventing and managing the global epidemic. *WHO Technical Report Series, Geneva* **2000**.
- Williams D.L., Grill H.J., Cummings D.E., Kaplan J.M.: Overfeeding-induced weight gain suppresses plasma ghrelin levels in rats. *J Endocrinol Invest* **2006**, 10: 863-868.
- Wortley K.E., Anderson K.D., Garcia K., Murray J.D., Malinova L., Liu R., Moncrieffe M., Thabet K., Cox H.J., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J., Sleeman M.W.: Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Nat Acad Sci* **2004**, 101: 8227-8232.
- Wortley K. E., del Rincon J.-P., Murray J. D., Garcia K., Iida K., Thorner M. O., Sleeman M. W.: Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest* **2005**, 115: 3573-3578.
- Wren A.M., Small C.J., Ward H.L., Murphy K.G., Dakin C.L., Taheri S., Kennedy A.R., Roberts

- G.H., Morgan D.G., Ghatei M.A., Bloom S.R.: The novel hypothalamic peptide Ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **2000**, 141: 4325-4328.
- Yanovski J.A.: Pediatric obesity. *Rev Endocr Metab Disord* **2001**, 2: 371-383.
- Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R., Day I.N.: An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* **2001**, 29: E88.
- Yeo G.S., Farooqi I.S., Aminian S., Halsall D.J., Stanhope R.G., O'Rahilly S.: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* **1998**, 20: 111-112.
- York D.A., Hansen B.: Animal models of Obesity. In Bray G.A., Bouchard C., James W.P.T.(Hrsg): Handbook of obesity. *Marcel Dekker Inc.*, **1997**.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Freidmann J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **1994**, 372: 425-432.
- Zigman J.M., Nakano Y., Coppari R., Balthasar N., Marcus J.N., Lee C.E., Jones J.E., Deysher A.E., Waxman A.R., White R.D., Williams T.D., Lachey J.L., Seeley R.J., Lowell B.B., Elmquist J.K.: Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* **2005**, 115: 3564-3572.

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen wie folgt veröffentlicht:

- Hinney A., Hoch A., Geller F., Schafer H., Siegfried W., Goldschmidt H., Remschmidt H., Hebebrand J.: *Ghrelin* gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J. Clin. Endocr. Metab.* **2002**, 87: 2716-2719

6.2 Abkürzungsverzeichnis

µl/µM/µmol	Mikroliter/-molar/-mol	HRR	‘Haplotype Relative Risk’
A	Adenin// Alanin	I	Isoleucin
Abb.	Abbildung	IGF-I	‘Insulin-Growth-Factor I’
ACTH	Adrenocorticotropin, Kortikotropin	K	Lysin
AGRP	‘Agouti related protein’	kb	Kilobase
Arg	Arginin	L/Leu	Leucin
ARMS	allelspezifische Amplifikation ‘amplification refractory mutation system’	M	Methionin
aqua bidest.	steriles bidestilliertes Wasser	MC4-R	Melanocortin 4 Rezeptor
AS	Aminosäure	MCH	Melanozyten-konzentrierendes- Hormon
Bis	N,N’-Methylenbisacrylamid	Met	Methionin
BMI	‘Body mass index’	ml/mM	Milliliter/-molar
bp	Basenpaare	mRNA	BotenRNA (messenger RNA)
BSA	Rinderserumalbumin ‘bovine serum albumin’	MSH	Melanotropin
C	Cytosin	N	Asparagin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure	n	Stichprobenumfang
CIDI	‘Composite International Diagnostic Interviews’	Ncl	‘Nucleus’
cM	Centimorgan	ng/nmol/nm	Nanogramm/Nanomol/Nano- meter
CRF	Kortikotropin-Releasing-Faktor	NPY	Neuropeptid Y
D	Aspartat	ob	<i>obese</i>
DAG	Deutsche Adipositas Gesellschaft	P	Prolin
db	<i>Diabetes</i>	p	Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms // Wahrscheinlichkeit
di/dNTP	Di/desoxynukleotidtriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	pmol	Picomol
DNA	Desoxyribonukleinsäure	POMC	Proopiomelanokortin
E	Glutamin	Q	Glutamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
F	Phenylalanin	QFS	‘Québec Family Study’
G	Guanin// Glycin	QTL	‘quantitative trait locus’
GH	Wachstumshormon, ‘Growth-hormon’	R	Arginin
GH-RH	‘Growth-hormon-Releasing- Faktor’	RCCB	‘Red cell lysis buffer’
GH-RP	‘Growth-hormon-Releasing- Peptides’	RFLP	Restriktionslängen- Polymorphismus
GHS	‘Growth-hormon- secretagogues’	RNA	Ribonukleinsäure
GHSR	‘growth hormone secretagogues receptor’	rpm	Umdrehungen pro Minute, ‘rounds per minutes’
Gln	Glutamin	S	Serin
H₂-Blocker	Protonenpumpenhemmer	SDS	Natriumdodecylsulfat// ‘Standard Deviation Scores’
H	Histidin	SNP	‘Single nukleotid polymorphism’
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits- Chromatographie, ‘high pressure liquid chromatography’	SOS	‘Swedish Obese Study’
		SSCP	Einzelstrang-Konformations- analyse: ‘Single strand conformation analysis’
		T	Thymidin// Threonin
		Tab.	Tabelle

TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer	tub	<i>Tubby</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer	U	Unit
TDT	‘Transmissions-Disequilibrium-Test’	UV	ultraviolette Licht
TE	Tris/EDTA-Puffer	V	Volt// Valin
TEMED	Tetra-methyl-etylen-diamin	w /v	‘weight per volume’
T_m	Schmelztemperatur	W	Wattphan// Trypto
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan	WHO	‘World Health Organization’
		Y	Tyrosin
		ZNS	Zentrales Nervensystem

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Einteilung in Gewichtsklassen (nach der WHO-Klassifizierung 2000)	3
Tab. 1.2: BMI-Altersperzentilen für verschiedene Gewichtsklassen (nach den Leitlinien der Deutschen Adipositas Gesellschaft 2002)	4
Tab. 1.3: Übersicht der bekannten Adipositas-Mausmodelle mit monogenem Vererbungsmuster [nach Pérusse et al., 2005]	8
Tab. 1.4: Beispiele für monogene und syndromale Formen der Adipositas beim Menschen [modifiziert nach Pérusse et al., 2005]	11
Tab. 2.1: Deskriptive Darstellung der Studiengruppen, ° initiale Studiengruppe, *erweiterte Studiengruppe	24
Tab. 2.2: Verwendete Großgeräte	25
Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen	26
Tab. 2.4: Puffer zur DNA-Extraktion, Gel-Elektrophorese, SSCP und RFLP für Ghrelin	27
Tab. 2.5: Verwendete Enzyme und ihre Bezugsquellen für Ghrelinanalysen	28
Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide für Ghrelin (Exon 1-4)	28
Tab. 3.1: Pronase-Reaktionsmix	30
Tab. 3.2: Spezielle PCR-Rezepte für Ghrelin (Exon 1-4); Alle Angaben in µl; *Puffer (Sigma, ohne MgCl ₂)	34
Tab. 3.3: Thermocycler-Bedingungen für die PCR von Ghrelin (Exon 1-4)	35

Tab. 3.4: Rezept für 10%iges SSCP-Gel	39
Tab. 3.5: Reaktionsmix für Sequenzierung	41
Tab. 3.6: Rezept für 6%iges Long-Ranger-Sequenzgel	41
Tab. 3.7: RFLP-Rezept für Ghrelin-Exon2 (Arg-51-Gln, Leu-72-Met). H ₂ O, Puffer, Enzym und PCR-Produkt stellen den Verdaumix dar.	43
Tab. 3.8: Design der ARMS-Primer zum Ausschluss von Fehlamplifikationen	44
Tab. 3.9: Schema einer Vierfeldertafel beim χ^2 -Test	48
Tab. 4.1: Ergebnisse zu den gefunden Sequenzvarianten von Ghrelin.	53
Tab. 4.2: Darstellung der Basen-Substitutionen der untersuchten SNPs im Ghrelin-Gen (Arg-51-Gln, Leu-72-Met, Gln-90-Leu) mit Auswirkung auf die DNA-Sequenz und Peptidebene	54
Tab. 4.3: Ergebnisdarstellung der detektierten Polymorphismen (Arg-51-Gln, Leu-72-Met, Gln-90-Leu) im Ghrelin-Gen.	56

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: BMI Perzentilen für Mädchen im Alter von 0-18 Jahren (nach Kromeyer-Hauschild et al. 2001)	4
Abb. 1.2: Pre-Pro-Ghrelin. Aminosäuren-Sequenz. Darstellung der Signalsequenz, der Sequenz des biologisch aktiven Ghrelins und der Endsequenz (Phoenix Pharmaceuticals, Inc 2000).	14
Abb. 1.3: Ghrelin-Peptidsequenz (Kojima et al., 2001)	15
Abb. 1.4: Synthese, Sekretion und Wirkweise vom Ghrelin vom Magen bis zur Hypophyse (Jung Yang, Phoenix Pharmaceuticals, 1999)	17
Abb. 1.5: Ghrelins Interaktion mit Leptin, NPY, AGRP, POMC und Alpha-MSH (Phoenix Pharmaceuticals, Inc 2001)	20

Abb. 3.1: PCR-Produkte auf Gelelektrophorese-Gel, Wasserprobe, 123 Basenpaarmarker	37
Abb. 3.2 ARMS-PCR-Ergebnis: Die unteren beiden Banden entsprechen dem 221 bp (T-Allel) und 244 bp (A-Allel) langem Fragment des Gln-90-Leu-Polymorphismus.	45
Abb. 4.1: Detektierte Sequenzvarianten in der Ghrelin-Sequenz.	51
Abb. 4.2: Darstellung der AS-Sequenz Ghrelins mit den detektierten Polymorphismen:	52

6.5 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Arnold¹, Aumüller¹, Barth¹, Basler¹, Baum¹, Beato¹, Çetin¹, Christiansen¹, Czubayko¹, Daut¹, Donner-Banzhoff¹, Doss¹, Engel¹, Feuser¹, Friess¹, Fritz¹, Fruhsdorfer¹, Geller¹, Gemsä¹, Geus¹, Göke¹, Gotzen¹, Gressner¹, Grimm¹, Grzeschik¹, Gudermann¹, Habermehl¹, Happle¹, Hasilik¹, Hebebrand¹, Hellinger¹, Hinney¹, Hinterhuber², Hoffmann¹, Janka³, Jungclas¹, Kalbfleisch¹, Kann¹, Kern¹, Klenk¹, Klose¹, Koch¹, Koehler¹, Koolman¹, Krause¹, Kretschmer¹, Krieg¹, Kroll¹, Lang¹, Lange¹, Lennarz¹, Leonhardt¹, Leppek¹, Lill¹, Lippert¹, Martin¹, Maisch¹, Mennel¹, Mergeauy³, Moll¹, Moosdorf¹, Müller¹, Neubauer¹, Neubüser³, Oertel¹, Peter¹, Ransmayr², Remschmidt¹, Richter¹, Rippentropp³, Röhm¹, Rothmund¹, Roz-Roland⁴, Savioz⁴, Schachtschabel¹, Schäfer¹, Schneider¹, Schneyer¹, Schüffel¹, Schulte-Körne¹, Schulz¹, Seifart¹, Seitz¹, Seybert¹, Šimić-Schleicher³, Slenczka¹, Sommer¹, Spahr⁴, Steiniger¹, Sturm¹, Vohland¹, Voigt¹, Wagner¹, Weihe¹, Wenk³, Werner¹, Westermann¹, v. Wichert¹, Wulf¹, Zorowka²

¹ in Marburg, ² in Innsbruck, ³ in Bremen, ⁴ in Sierre-Loèche

6.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem dem Leiter der Klinischen Forschergruppe an der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters, Herrn Prof. Dr. Johannes Hebebrand und der Laborleiterin Frau Dr. Anke Hinney für die Bereitstellung des interessanten und immer noch aktuellen Themas. Beide haben mich bei der Durchführung dieser Arbeit kontinuierlich unterstützt und waren jederzeit für Fragen offen. Ankes Einsatz und ihrer Arbeitsauffassung war es zu verdanken, dass im Labor ein sehr angenehmes und freundliches Arbeitsklima vorherrschte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den damaligen Mitarbeiterinnen: Anne, Elke, Gerti, Güdrün, Nadine und Susann Sonnenschein. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit ihnen zusammenzuarbeiten. Ein besonderer Dank geht an Benjamin Antwerpen, der mir nicht nur als Mit-Doktorant, ehemaliger Feuerwehrmann und Elchjäger mit seiner Präzision und seinem Pflichtbewusstsein bis zur Vollendung der Dissertation zur Seite stand. Fraglich ist, ob es in der Zeit nach uns im Fett-Forscherteam jemals wieder einen solch vorschriftsgemäßen Spüldienst gab, vor allem bezüglich der Notduschen. Auch Constanze danke ich für ihren Teamgeist.

Frank Geller danke ich für seine starken Nerven und unermüdlichen Erklärungen auf meine scheinbar unverständlichen biomathematischen Probleme.

Großen Dank an alle, die geduldig diese Arbeit Korrektur lasen und mir Anregungen sowie konstruktive Ratschläge nahe legten, nennen möchte ich insbesondere meinem Onkel Peter Barkey und Séverine Lenoir.

Abschließend möchte ich den beteiligten Patienten und Patientinnen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.